

29. 3. 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

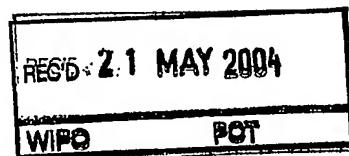
出願年月日 Date of Application: 2003年 7月14日

出願番号 Application Number: 特願2003-274232

[ST. 10/C]: [JP2003-274232]

出願人 Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構
国立感染症研究所長

BEST AVAILABLE COPY

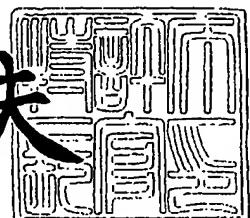


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 P1281507
【提出日】 平成15年 7月14日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県川崎市高津区梶ヶ谷2-8-1-202
 【氏名】 花田 賢太郎
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区宮前平1-4-29 A-101
 【氏名】 西島 正弘
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都足立区谷中1-33-28-101
 【氏名】 熊谷 圭悟
【特許出願人】
 【識別番号】 396020800
 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【特許出願人】
 【識別番号】 591222245
 【氏名又は名称】 国立感染症研究所長
【代理人】
 【識別番号】 100098682
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 赤塚 賢次
 【電話番号】 03-3251-5108
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 047692
 【納付金額】 10,500円
【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 1/2
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

配列番号1のアミノ酸配列を有するhCERTタンパク質、配列番号2のアミノ酸配列を有するhCERTLタンパク質、配列番号3のアミノ酸配列を有するcCERTタンパク質、または配列番号4のアミノ酸配列を有するcCERTLタンパク質、又はそれらの組換えタンパク質を有効成分として含有するセラミド輸送を促進する薬剤。

【請求項2】

制ガン剤、抗炎症剤、器官再生剤、抗感染症剤、又は化粧品用の分配促進剤として用いられる薬剤であることを特徴とする請求項1に記載される薬剤。

【請求項3】

セラミド輸送を阻害する薬剤の検出に用いられることを特徴とする請求項1に記載される薬剤。

【請求項4】

配列番号1または3のアミノ酸配列の第370残基～第598残基、あるいは配列番号2又は4のアミノ酸配列の第397残基～第624残基からなる組換えタンパク質を有効成分とすることを特徴とする請求項1のセラミド輸送を促進する薬剤。

【請求項5】

請求項1に記載される薬剤を生産するために用いられることを特徴とする配列番号5、6、7または8の塩基配列、又はその組換え塩基配列。

【請求項6】

配列番号5の塩基配列の第1108塩基対～第1794塩基対、配列番号6の塩基配列の第1189塩基対～第1872塩基対、配列番号7の塩基配列の第1539塩基対～第2225塩基対、又は配列番号8の塩基配列の第1189塩基対～第1872塩基対からなる組換え塩基配列であることを特徴とする請求項5に記載の塩基配列。

【請求項7】

セラミドを含有する脂質膜とセラミド遊離を促進する薬剤とを混合して得られた混合物を保温する保温工程を行い、遠心法で分離することにより保温した後の混合物から上清を得る分離工程を行い、次いで、得られた上清に含有されるセラミドを定量する定量工程を行うことを特徴とするセラミド遊離を促進する活性の測定方法。

【請求項8】

前記セラミドを含有する脂質膜が、ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの混合脂質にセラミドを添加して調製されたものであることを特徴とする請求項8に記載されるセラミド遊離を促進する活性の測定方法。

【請求項9】

前記セラミドを含有する脂質膜が、超音波処理されたものであることを特徴とする請求項7又は8に記載されるセラミド遊離を促進する活性の測定方法。

【請求項10】

前記セラミドを含有する脂質膜に添加されるセラミドが、放射性標識されたセラミドであることを特徴とする請求項7に記載されるセラミド遊離を促進する活性の測定方法。

【請求項11】

受容膜とセラミド輸送を促進する薬剤とセラミドを含有する供与膜とを混合し、得られた混合物を保温する保温工程を行い、保温工程で得られた混合物に選択的膜凝集剤を添加後、遠心法に供して受容膜と供与膜を分離する分離工程を行い、分離した受容膜及び供与膜がそれぞれ含有するセラミドを定量する定量工程を行うことを特徴とするセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法。

【請求項12】

前記受容膜が、ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの混合脂質で調製されたものであることを特徴とする請求項11に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法。

【請求項13】

前記セラミドを含有する供与膜が、ホスファチジルコリンと、ホスファチジルエタノールと、ラクトシルセラミドと、セラミドとを含有する混合脂質から調製されることを特徴とする請求項11又は12に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法。

【請求項14】

前記セラミドを含有する供与膜に添加されるセラミドが、放射性標識されたセラミドであることを特徴とする請求項11に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法。

【請求項15】

前記選択的膜凝集剤がヒマ豆レクチンであることを特徴とする請求項10～14のいずれか1項に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】セラミド輸送を促進する薬剤、該薬剤を製造する塩基配列、セラミド遊離を促進する活性の測定方法、及びセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法。

【技術分野】

【0001】

本発明は、セラミド輸送を促進する薬剤、該薬剤を製造する塩基配列、セラミド遊離を促進する活性の測定方法、及びセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

スフィンゴ脂質は、真核生物に普遍的に存在する脂質である。スフィンゴ脂質は、細胞増殖・分化、炎症反応、及び細胞死といった様々な細胞機能だけでなく、宿主細胞への病原体感染や毒素進入などに重要な役割をはたしている。よって、その代謝や局在に影響を与えるタンパク質や化学物質の発見・発明が望まれている。

【0003】

セラミドは、スフィンゴ脂質合成の中間体として生合成される分子であり、また、複合スフィンゴ脂質の分解によっても生じる分子である。生体内セラミドは、複合脂質合成中間体としての役割だけでなく、細胞増殖や細胞死を制御する役割、および、皮膚組織の保水性維持を司る役割の点から特に注目されている。セラミドは、疎水性が大変高く水に全く溶けず、それ単独では膜間移動速度が極めて遅い。そこで、従来、セラミドを細胞に与える場合、非特許文献1～3に記載されるように短いアシル鎖にして親水性を上げた短鎖セラミドを代替利用したり、また、非特許文献4に記載されるようにエタノール・ドデカン混液に溶かした天然型セラミドを供することが行われてきた。しかしながら、前者の方法では短鎖セラミドが天然型セラミドの機能を不完全にしか模倣しないことが、一方、後者の方では有機溶媒の毒性が、それぞれ大きな問題となる。これらの問題を解決するには、天然型セラミドの膜間移動を選択的に触媒するような親水性分子の利用によりセラミドを細胞に与える方法が考えられる。しかし、そのような親水性分子は発見・発明されていなかった。

【0004】

細胞内では、小胞体で生合成されたセラミドは効率よくゴルジ体へと移動してスフィンゴミエリン(SM)へと変換している。しかし、セラミドの膜間輸送にどのような特異的分子が関わっているかは不明であった。

【0005】

また、最近、一酸化窒素で誘導されるグリオーマ細胞の細胞死において、細胞内セラミド輸送の阻害が起こることが示されている。よって、セラミド輸送に特異的に関わる生体分子は、例えば、セラミド輸送を促進する生体分子は、細胞の生死を制御する新規な薬剤としても期待されるが、上述したようにセラミド輸送に関わる生体分子は不明のままであった。

【非特許文献1】van Blitterswijk, W.J., van der Luit, A.H., Veldman, R.J., Verheij, M. and Borst, (J. Biochem. J. 369, 199-211., 2003)

【非特許文献2】Hannun, Y.A. and Luberto, C. (Trends Cell Biol. 10, 73-80., 2000)

【非特許文献3】Mathias, S., Pena, L.A. and Kolesnick, R.N. (Biochem. J. 335, 465-480., 1998)

【非特許文献4】Ji, L., Zhang, G., Uematsu, S., Akahori, Y. and Hirabayashi, Y. (FEBS Lett. 358, 211-4., 1995)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、本発明の目的は、セラミド輸送を促進する薬剤、該薬剤を製造する塩基配列、

セラミド遊離を促進する活性の測定方法、及びセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

かかる実情において、本発明者らは鋭意検討を行った結果、細胞内セラミド輸送が欠損しているためにSM含有量が低下している動物培養細胞突然変異株(以下LY-A株とも述べる)を分離し、この変異株を用いた解析から、細胞内セラミド輸送には細胞質タンパク質が必須因子として関わっていることを明らかにし、SM含有量の低下した細胞を選択的に死滅させる条件を発見し、かかる条件においてLY-A株の細胞の機能回復株、すなわち、細胞内セラミド輸送が回復するためにSM含有量が回復した機能回復株を選択する方法においてグッドパスチュア抗原結合タンパク質(Goodpasture antigen-binding protein; 以下GABPタンパク質と述べることがある)の別スプライシング型産物(以下GPBP△26タンパク質と述べることがある)と本質的な配列が同質なタンパク質(以下CERTタンパク質と述べることがある)が含有されている場合に機能回復株が得られることを知見し、細胞内セラミド輸送の促進に該CERTタンパク質を有効成分として含有する薬剤が有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明(1)は、配列番号1のアミノ酸配列を有するhCERTタンパク質、配列番号2のアミノ酸配列を有するhCERT_Lタンパク質、配列番号3のアミノ酸配列を有するcCERTタンパク質、または配列番号4のアミノ酸配列を有するcCERT_Lタンパク質、又はそれらの組換えタンパク質を有効成分として含有するセラミド輸送を促進する薬剤を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明(1)は、セラミド輸送を促進する新規な薬剤を提供することができるという効果を奏する。

【0009】

また、本発明(2)は、制ガン剤、抗炎症剤、器官再生剤、抗感染症剤、又は化粧品用の分配促進剤として用いられる薬剤である前記発明(1)に記載される薬剤を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明(2)は、前記発明(1)が奏する効果に加えて、新規な制ガン剤、抗炎症剤、器官再生剤、抗感染症剤、又は化粧品用の分配促進剤を提供することができるという効果を奏する。

【0010】

また、本発明(3)はセラミド輸送を阻害する薬剤の検出に用いられる前記(1)に記載される薬剤を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明(3)は、前記発明(1)が奏する効果に加えて、新規な薬剤の開発方法を提供することができるという効果を奏する。

【0011】

また、本発明(4)は、配列番号1または3のアミノ酸配列の第370残基～第598残基、あるいは配列番号2又は4のアミノ酸配列の第397残基～第624残基からなる組換えタンパク質を有効成分とする前記発明(1)のセラミド輸送を促進する薬剤を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明(4)は、前記発明(1)が奏する効果に加えて、セラミド輸送を促進する活性が顕著に向上するという効果を奏する。

【0012】

また、本発明(5)は、前記発明(1)に記載される薬剤を生産するために用いられる配列番号5、6、7または8の塩基配列、又はその組換え塩基配列を提供するものである。

また、本発明(6)は、配列番号5の塩基配列の第1108塩基対～第1794塩基対、配列番号6の塩基配列の第1189塩基対～第1872塩基対、配列番号7の塩基配列の第1539塩基対～第2225塩基対、又は配列番号8の塩基配列の第1189塩基対～第1872塩基対からなる組換え塩基配列であることを特徴とする前記発明(5)に記載の塩基配列を提供するものである。

【0013】

また、本発明（7）は、セラミドを含有する脂質膜とセラミド遊離を促進する薬剤とを混合して得られた混合物を保温する保温工程を行い、遠心法で分離することにより保温した後の混合物から上清を得る分離工程を行い、次いで、得られた上清に含有されるセラミドを定量する定量工程を行うセラミド遊離を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（7）は、新規なセラミド遊離を促進する活性の測定方法を提供することができるという効果を奏する。

【0014】

また、本発明（8）は、前記セラミドを含有する脂質膜が、ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの混合脂質にセラミドを添加して調製されたものである前記発明（7）に記載されるセラミド遊離を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（8）は、前記発明（7）が奏する効果に加えて、セラミド遊離を促進する活性の測定を精度よく行うことができるという効果を奏する。

【0015】

また、本発明（9）は、前記セラミドを含有する脂質膜が、超音波処理されたものである前記発明（7）又は（8）に記載されるセラミド遊離を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（9）は、前記発明（7）又は（8）が奏する効果に加えて、セラミド遊離を促進する活性の測定を精度よく行うことができるという効果を奏する。

【0016】

また、本発明（10）は、前記セラミドを含有する脂質膜に添加されるセラミドが、放射性標識されたセラミドである前記発明（8）に記載されるセラミド遊離を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（10）は、前記発明（8）が奏する効果に加えて、定量工程におけるセラミドの定量を簡便に行うことができるという効果を奏する。

【0017】

また、本発明（11）は、受容膜とセラミド輸送を促進する薬剤とセラミドを含有する供与膜とを混合し、得られた混合物を保温する保温工程を行い、保温工程で得られた混合物に選択的膜凝集剤を添加後、遠心法に供して受容膜と供与膜を分離する分離工程を行い、分離した受容膜及び供与膜がそれぞれ含有するセラミドを定量する定量工程を行うセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（11）は、新規なセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供することができるという効果を奏する。

【0018】

また、本発明（12）は、前記受容膜が、ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンとの混合脂質で調製されたものである前記発明（11）に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（12）は、前記発明（11）が奏する効果に加えて、セラミドの膜間移動を促進する活性の測定を精度よく行うことができるという効果を奏する。

【0019】

また、本発明（13）は、前記セラミドを含有する供与膜が、ホスファチジルコリンと、ホスファチジルエタノールと、ラクトシルセラミドと、セラミドとを含有する混合脂質から調製される前記発明（11）又は（12）に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（13）は、前記発明（11）又は（12）が奏する効果に加えて、セラミドの膜間移動を促進する活性の測定を精度よく行うことができるという効果を奏する。

【0020】

また、本発明（14）は、前記セラミドを含有する供与膜に添加されるセラミドが、放射性標識されたセラミドである前記発明（11）に記載されるセラミドの膜間移動を促進

する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（14）は、前記発明（11）が奏する効果に加えて、定量工程におけるセラミドの定量を簡便に行うことができるという効果を奏する。

【0021】

また、本発明（15）は、前記剤がヒマ豆レクチンである前記発明（11）～（14）のいずれか一項に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（15）は、前記発明（11）～（14）が奏する効果に加えて、分離工程における分離を簡便且つ迅速に行うことができるという効果を奏する。

【発明の効果】

【0022】

本発明は、セラミド輸送を促進する新規な薬剤を提供することができる。また、本発明は、本発明の薬剤を生産するために用いられる塩基配列を提供することができる。また、本発明は、新規なセラミド遊離を促進する活性の測定方法を提供することができる。さらに、本発明は、新規なセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

本発明の薬剤は、配列番号1のアミノ酸配列を有するhCERTタンパク質、配列番号2のアミノ酸配列を有するhCERT_Lタンパク質、配列番号3のアミノ酸配列を有するcCERTタンパク質、または配列番号4のアミノ酸配列を有するcCERT_Lタンパク質、又はそれらの組換えタンパク質を有効成分するものである。hCERTタンパク質及びcCERTタンパク質、並びにhCERT_Lタンパク質及びcCERT_Lタンパク質のドメイン構造及びこれらのタンパク質のドメイン欠失構造を図1に示す。CERTタンパク質は、図1に示すように、アミノ末端約120アミノ酸領域にプレクストリンホモロジー(PH)ドメインを、カルボキシル末端約230アミノ酸領域にステロイドジェック急性制御タンパク質関連脂質転移(steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer; START)ドメインを、それらの中間領域(middle region, MR)のドメインと大きく3つのドメインを持っていると考えられている。CERTタンパク質及び以下で述べるCERT_Lタンパク質は、それぞれ哺乳動物間で95%以上の高いアミノ酸配列同一性を保持しており、それらタンパク質が持つ諸性質は哺乳動物全般で同質と考えられる。よって、ヒトもしくはCHO細胞由來のもので具体的な実施例を提示していくとこれらの種に限定されるものではない。ここで、CERTタンパク質とは、ヒト細胞から得られたhCERTタンパク質及びハムスター細胞から得られたcCERTタンパク質並びにその他の哺乳動物の細胞から得られた類似のタンパク質を示し、CERT_Lタンパク質とは、ヒト細胞から得られたhCERT_Lタンパク質及びハムスター細胞から得られたcCERT_Lタンパク質並びにその他の哺乳動物の細胞から得られた類似のタンパク質を示す。

【0024】

ヒトCERT(hCERT)タンパク質は、次のようにして得ることができる。LY-A株のSM含量を回復させる相補的デオキシリボ核酸(cDNA)を以下の手順に従って単離・同定する。ヒト培養細胞由来のcDNAライブラリーをレトロウイルスベクターを用いて高頻度かつ安定にLY-A株に導入後、機能回復株を単離する。ここで用いた機能回復株選択法は、SM含量の減少した細胞がコレステロール引き抜き試薬・メチルシクロデキストリン(MCD)に高感受性になり、SM含量が回復した細胞がMCDに対する耐性を回復するという知見をもとにして行うことができる。ついで、単離した機能回復株に導入されているcDNAをゲノミック・ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)法によって増幅して回収した。回収したcDNAは二次導入でもLY-A株を野生株レベルのMCD感受性へと変化させるものである。このようにして得られた配列番号5に記載されるcDNAのコードするタンパク質は、ヒトGPBP△26(hGPBP△26)として過去に発表されているタンパク質と同一であった。GPBP△26の細胞内での機能は未解決であった。本明細書に詳述するように、我々は、GPBP△26の細胞内の機能はセラミド輸送(ceramide trafficking)であることを発見したので、細胞内の機能

を表した命名法するために、GPBP△26と実質的に同一の配列を有するタンパク質をCERTタンパク質と命名した。また、GPBPと実質的に同一の配列を有するタンパク質をCERT_L(a large splicing variant of CERT)と命名した。単離・同定したcDNAを、例えば、大腸菌、酵母などの細菌、Sf9細胞などの昆虫培養細胞、CHO細胞、HeLa細胞、HEK293細胞などの哺乳動物培養細胞などで公知の方法によって発現させることにより、CERTタンパク質を得ることができる。

【0025】

無細胞系においてヒト・コラーゲン4型のアルファ3鎖のカルボキシル末端配列に結合して、それをリン酸化するタンパク質として、ヒトGPBP(hGPBP)が報告されている。また、非特許文献2においては、hGPBPよりも26アミノ酸小さい別スプライシング型産物・hGPBP△26も存在していることが報告されている。転写RNAレベルの解析から、hGPBP及びhGPBP△26はともに様々な器官で発現していることが示されているが、hGPBP△26のほうが優勢に発現していることが示されている。しかしながら、hGPBP△26およびhGPBPは細胞質に主に局在しており、この局在は、細胞外分子であるコラーゲンを修飾するという最初に期待された機能とは矛盾している。よって、細胞内でのこれらタンパク質の生理的機能は過去の研究からは解明されていないと考えられるが、本発明者らによって、セラミド輸送を促進する薬剤として有効であることが示された。

【0026】

また、CERTタンパク質の組換えタンパク質としては、N末端のアミノ酸を第1残基として、STARTドメイン、すなわち、配列番号1又は3の第371残基～第598残基あるいは配列番号2又は4の第397残基～第624残基を含有する断片を挙げることができ、このような断片は、in vitro組換えDNA法、合成法、およびin vivo組換え／遺伝子組換えにより得られたDNA断片を発現させて得られた組換えタンパク質が挙げられる。このようなタンパク質として、PHドメインを欠いたCERT△PHタンパク質、MRドメインを欠いたCERT△MRタンパク質、STドメインのみを有するST CERTタンパク質などのドメイン欠失タンパク質を例示することができる。なお、CERTタンパク質の370番目のアミノ酸であるリシン残基は、MRドメインのカルボキシル末端に相当すると予想される。しかし、カルボキシル末端のリシン残基によってタンパク質が不安定になる可能性があるので、ドメイン欠失タンパク質においては、当該リシン残基をSTARTドメインのアミノ末端に組み入て、MRドメインから除いている。

【0027】

さらに、hCERTタンパク質とアミノ酸塩基配列が本質的に同一である組換えタンパク質であるhGABP△26タンパク質は、Raya, Aらの方法(J. Biol. Chem. 275, 40392-9, 2000)により得られたプラスミドベクターを用いて、Raya, Aらの方法(J. Biol. Chem. 274, P12642-9, 1999)に従って発現を行い、生成物を精製することにより得ることもできる。

【0028】

hCERT_Lタンパク質と本質的に同等な組換えタンパク質であるhGPBPのcDNAの配列は公知の方法によって得ることができる(GenBank番号: AF136450)。よって、不足しているDNA配列をPCR法によってhCERT配列に付加することで、hCERT_Lをコードする配列番号6のDNA配列を得ることができる。そして、得たcDNAから調製したプラスミドベクターを用いて発現を行い、生成物を精製することでhCERT_Lタンパク質を得ることができる。また、当該hCERT_Lタンパク質は、Raya, Aらの方法(J. Biol. Chem. 274, P12642-9, 1999)に従って、cDNAから調製したプラスミドベクターを用いて発現を行い、生成物を精製することにより得ることもできる。

【0029】

さらに、配列番号7の塩基配列に対応するCHO細胞由来のCERT(cCERT)の全長cDNA配列は、cDNAをクロントック社SMART RACE cDNA增幅キットを用いて、cDNA末端の迅速增幅(rapid amplification of cDNA ends; RACE)を行うことで決定することができる。そして、CHO細胞cDNAライブラリーをテンプレートにしたPCRを行うことで、cCERTのORFを得ることができる。また、このPCRによって、配列番号番号8の塩基配列に対応するCHO細胞由来の

CERT_L (cCERT_L)をコードする DNA配列を増幅し、クローニングすることもできる。cCERT_L のアミノ酸配列は配列番号4に示している。

【0030】

本発明の薬剤は、例えば、細胞死を促進または抑制させて、制ガン剤、抗炎症剤、器官再生剤、又は抗感染症剤として用いることができる。また、セラミドの分配促進剤として化粧品において用いることができる。さらに、セラミド輸送タンパク質の阻害剤探索のために利用することもできる。

【0031】

本発明の薬剤は、注射、急速注入、鼻咽頭吸収、皮膚吸収により、非経口的に、および経口的に投与し得る。非経口投与のための製薬上許容可能な担体調製物としては、滅菌、あるいは水性または非水性の溶液、懸濁液および乳濁液が挙げられる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、注射可能有機エステル、例えばエチルオレエートである。閉塞性包帯用の担体は、皮膚透過性を増大し、抗原吸収を増強するために用い得る。経口投与のための液体投薬形態は一般に、液体投薬形態を含有するリポソーム溶液を包含し得る。リポソームを懸濁するための適切な形態としては、当業界で一般に用いられる不活性希釈剤、例えば精製水を含有する乳濁液、懸濁液、溶液、シロップおよびエリキシルが挙げられる。不活性希釈剤の他に、このような組成物は、アジュバント、潤滑剤、乳化剤および沈殿防止剤、ならびに甘味剤、風味剤および香料も含有し得る。

【0032】

本発明の薬剤は、アジュバントを含有することも可能である。アジュバントは、特異的免疫応答を非特異的に増大するために用い得る物質である。アジュバントは、それらの粗製に基づいて、大まかにいくつかの群に分けられる。

【0033】

これらの群としては、油アジュバント（例えば、フロイントの完全および不完全アジュバント）、無機塩（例えば、AlK(SO₄)₂、AlNH₄(SO₄)、シリカ、ミョウバン、Al(OH)₃、Ca₃(PO₄)₂、カオリンおよび炭素）、ポリヌクレオチド（例えばポリICおよびポリAU酸）、ならびにある種の天然物質（例えば、結核菌Mycobacterium tuberculosisからのロウD、ならびにCorynebacterium parvum、百日咳菌Bordetella pertussisおよびブルセラ族の成員に見出される物質）が挙げられる。

【0034】

発見者らは、セラミドを含む脂質膜をCERTタンパク質とともに保温後、遠心すると、脂質膜に残存するセラミドは沈降し、脂質膜から遊離したセラミドは上清に移行することを見出し、セラミドの遊離を促進する活性を測定する方法を発明した。以下に本発明のセラミド遊離を促進する活性の測定方法について以下に述べる。セラミドを含有する脂質膜としては、特に制限されないが、卵黄由来のホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの混合脂質、または合成ホスファチジルコリンと合成ホスファチジルエタノールアミンの混合脂質にセラミドを添加して調製したものを例示することができる。このようにして得られたセラミドを含有する脂質膜は、窒素、アルゴンなどの不活性ガスを吹き付けること、または減圧乾燥によって乾固することができる。また、脂質膜又は乾固した脂質膜にNaClおよびEDTAを添加したヘペス-NaOH緩衝液、トリス塩酸緩衝液などの緩衝液を添加して浴槽型超音波発生器で超音波処理する方法などによって超音波処理すること也可能である。超音波処理条件としては、例えば20～25℃で行い、3～6分間の超音波処理を行う条件を挙げることができる。

【0035】

前記混合脂質に添加するセラミドとしては、放射性標識していないものでもよいが、測定の便宜を考えると、放射性標識されているセラミドが好ましく、このようなセラミドとして¹⁴C、³H、¹³N、¹⁵Oなどによって放射性標識されるセラミドを挙げることができると、このうち、¹⁴Cによって放射性標識されたセラミドが、入手のしやすさや安定性及び³H標識された別の脂質との二重標識実験が可能になることを考慮すると、好ましい。

【0036】

セラミド遊離を促進する薬剤としては、特に制限されないが、上記した本発明のセラミド輸送を促進する薬剤を例示することができる。

【0037】

保温工程において、セラミドを含有する脂質膜とセラミド遊離を促進する薬剤とを混合する方法としては、特に制限されないが、前記薬剤を、NaClおよびEDTAを添加したヘペス-NaOH緩衝液、トリス塩酸緩衝液緩衝液などの緩衝液に分散させて前記脂質膜を添加する方法を挙げることができる。また、保温する方法としては、恒温槽、湯浴槽などによって、15～42℃で10～250分間保温する方法を挙げることができる。

【0038】

分離工程においては、保温した後の混合物を50,000×gで30～60分間遠心分離して上清を得る。

【0039】

定量工程においては、セラミドが放射性標識されている場合においては、上清に含有されるセラミドの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することにより上清中に含有されるセラミドを定量することができる。また、上清に含有される脂質をTLCで分離した後、セラミドの放射活性をイメージアナライザーで解析することでも定量することができる。セラミドが放射性標識されていない場合においては、質量分析機器を用いた解析や大腸菌ジアシルグリセロールを用いたセラミド定量法などで測定して上清中に含有されるセラミドを定量することができる。

【0040】

本発明のセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法について以下に述べる。セラミドを含有する供与膜としては、特に制限されないが、卵黄由来のホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンとブタ組織由来ラクトシルセラミドの混合脂質、または化学合成したホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンとラクトシルセラミドの混合脂質にセラミドを添加して調製したものを例示することができる。ラクトシルセラミドのかわりにビオチン化ホスファチジルエタノールアミンを利用することも可能である。このようにして得られたセラミドを含有する供与膜は、窒素、アルゴンなどの不活性ガスを吹き付けること、または減圧乾燥によって乾固することができる。また、供与膜又は乾固した供与膜にNaClおよびEDTAを添加したヘペス-NaOH緩衝液、トリス塩酸緩衝液緩衝液などの緩衝液を添加して投げ込み式超音波発生器で超音波処理する方法などによって超音波処理することも可能である。

【0041】

前記混合脂質に添加するセラミドとしては、上記したセラミド遊離を促進する活性の測定方法と同様のものを挙げることができる。

【0042】

受容膜としては、卵黄由来のホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンまたは合成ホスファチジルコリンと合成ホスファチジルエタノールアミンの混合脂質などを用いることができる。

【0043】

受容膜とセラミド輸送を促進する薬剤とセラミドを含有する供与膜との混合方法及び得られた混合物を保温する方法としては、セラミド遊離を促進する活性の測定方法の保温工程と同様に行うことができる。

【0044】

保温工程で得られた混合物に添加する選択的膜凝集剤としては、ヒマ豆レクチンを挙げることができる。ヒマ豆レクチンは、ラクトシルセラミドに含まれるガラクトシル基に結合するため、供与膜とヒマ豆レクチンからなる凝集塊を形成し、低速の遠心分離によって供与膜だけを選択的に沈降させることができる。ラクトシルセラミドのかわりにビオチン化ホスファチジルエタノールアミンを利用する場合は、アビジンやストレプトアビジンなどのビオチン結合試薬を選択的膜凝集剤として使用することができる。また、保冷は、氷

浴、冷蔵庫などを用いて、0～4℃で5～15分間行うことができる。

【0045】

保冷工程で得られた混合物を分離する分離工程においては、選択的膜凝集剤添加後に冷却した混合物を12,000 × gで3～10分間分間遠心分離して上清及び沈降した供与膜を得る。また、得られた供与膜は、SDS、オクチルグルコシド、クロロホルム等に溶解させて定量工程において用いることができる。

【0046】

定量工程は、セラミド遊離を促進する活性の測定方法と同様に行うことができる。

【0047】

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、これは単に例示であって、本発明を制限するものではない。なお、下記実施例において、基本的な分子生物学的操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング (Molecular Cloning) 第2版」 [Sambrook, J., Fritsch, E.F. および Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press より1989年に発刊] もしくは「カレントプロトコル・イン・モレキュラーバイオロジー (Current Protocol in Molecular Biology)」 [Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. および Struhl, K. 著、Wiley and Sons社から1987から現在に至るまで続刊中] に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

<実施例で用いた試料>

- ・ヒト・ヘラ・レトロウイルスライブラリー (Human HeLa Retroviral library)、pLIBベクター、pLIB-EGFP、pEGFP-N3 および SMART™ RACE cDNA 増幅キットは、クロンテック (Clontech) 社製のものを用いた。
- ・pcDNA3.1/Hyg(+)、pcDNA3.1/Neo(+)、リポフェクタミンプラス (LipofectAMINE PLUS™) 試薬、pcDNA3.1/V5-His-TOPO(R) ベクター、pCR-Blunt II-TOPO (登録商標名) ベクター、スーパースクリプト・ファーストストランド (SuperScript™ First Strand) 合成システム、および合成オリゴヌクレオチドは、インビトロゲン (Invitrogen) 社からそれぞれ購入したもの用いた。
- ・ニュートリドーマ (Nutridoma™) SP、フージーン (FuGENE™) 6 トランスフェクション試薬、ハイグマイシンB および プロテアーゼ阻害剤カクテル (Complete™ EDTA-free) はロシュ・アプライドサイエンス (Roche Applied Science) 社から購入したものを用いた。
- ・LA PCR™ キットおよびパイロベスト (登録商標名: Pyrobest) DNAポリメラーゼはタカラ (Takara) 社から購入したものを用いた。
- ・KOD-Plus-DNAポリメラーゼは東洋紡績社から購入したものを用いた。
- ・pBlueScript(R) SKII(pBS) ベクターはストラタジーン (Stratagene) 社から、購入したものを用いた。
- ・プラスミドの小スケール精製には、プロメガ (Promega) 社製のウイザードプラス (Wizard PLUS) SV システムを用いた。
- ・プラスミドの大スケール精製とゲノムDNA精製には、カイアゲン (Qiagen) 社のHiSpeed プラスミドキットとゲノムチップシステムをそれぞれ使用した。
- ・制限酵素類は、タカラ社、東洋紡績、またはニューイングランド・バイオラボ (New England Biolabs) 社から購入した。
- ・pET-28a(+)ベクターおよび大腸菌BL21(DE3) 株は、ノバゲン (Novagen) 社から購入した。
- ・アレキサフルオロ (登録商標名 Alexa Fluor) 594 ヤギ抗マウス免疫グロブリンG、6-[N-(7-ニトロベンゼゾー-2-オキサ-1, 3-ジアゾール-4-イル) アミノ] カプロイル-D-エリスロースフィンゴシン (6-[N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] caproyl-d-erythro-sphingosine; C₆-NBD-Cer) および N-(4, 4-ジフルオロ-5, 7-ジメチル-4-ボラ3a, 4a-ジアザ-3-インダセン-3-ペンタノイル)-D-エリスロースフィンゴシン (N-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-d-erythro-sphingosine; C₅-DMB-Cer) はモレキュラー・プロープ (Molecular Probe) 社から購入し

たものを用いる。

- ・メチルベータシクロデキストリン(methyl- β -cyclodextrin; MCD)、G418、ポリブレン、抗FLAG(登録商標名) M2モノクローナル抗体、脂肪酸除去済みウシ血清アルブミン(BSA)はシグマ社から購入。
- ・卵黄由来ホスファチジルコリン、卵黄由来ホスファチジルエタノールアミンはアバンティ・ポラーリピド(Avanti Polar Lipids)社から購入した。
- ・ポリビニリデン・ジフルオリド(polyvinylidene difluoride; PVDF)膜およびホースラディッシュ・パーオキシダーゼ(horseradish peroxidase; HRP)結合ヤギ抗マウス免疫グロブリンGはバイオラド(Bio-Rad)社から購入した。
- ・BD Living ColorsTM A.v. モノクローナル抗体はクロントック社から購入した。
- ・N-パルミトイール-D-エリスロースフィンゴシン(C16-セラミド)は、バイオモル・リサーチ
- ・ラボラトリー社(BIOMOL Research Laboratories) 購入したもの用いた。
- ・ブタ組織由来ラクトシルセラミドはマトレーヤ(Matreyer)社から購入したもの用いた。
- ・ヒマ豆レクチン(RCA120)はホーネン社から購入したもの用いた。
- ・薄層クロマトグラフィー(TLC)板はメルク社から購入したもの用いた。

3-(4, 5-ジメチル-2-チアゾイル)-2, 5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムプロミド(MTT)は同仁化学研究所から入手したもの用いた。

- ・マウス抗G28モノクローナル抗体はストレスゲン(StressGen)社から購入したもの用いた。
- ・L-[2, 3, 4, 5-³H]アルギニン(71 Ci/mmol), L-[U-¹⁴C]セリン(155 mCi/mmol)、[メチル-¹⁴C]コリン(55 mCi/mmol)、[1a, 2a(n)-³H]コレステロール(49Ci/mmol)、メガプライム(Me gaprime)DNAラベリングキットおよび増感化学発光(enhanced chemiluminescence; ECL)システムはアマシャム・バイオサイエンス(Amersham Bioscience)社から購入したもの用いた。
- ・[パルミトイール-1-¹⁴C] N-パルミトイール-D-エリスロースフィンゴシン(55 mCi/mmol)、[オレオイル-1-¹⁴C]ジオレオイル-rac-グリセロール(55mCi/mmol)、[コリンメチル-¹⁴C]スフィンゴミエリン(55 mCi/mmol)、[ジパルミトイール-1-¹⁴C] L- α -ジパルミトイールホスファチジルコリン(55mCi/mmol)、[2-パルミトイール-9, 10-³H(N)] L- α -ジパルミトイールホスファチジルコリン(40 mCi/mmol)、D-エリスロ-[3-³H]スフィンゴシン(20Ci/mmol)はアメリカン・ラジオラベル・ケミカル社(American Radiolabeled Chemicals, Inc.)から購入したもの用いた。ただし、購入した[パルミトイール-1-¹⁴C] N-パルミトイール-D-エリスロースフィンゴシンに分解物が混在しているよう場合は、TLCで精製した後に使用した。
- ・[α -³²P]dCTP(3000 Ci/mmol)はパーキンエルマー(PerkinElmer)社から、それぞれ購入したもの用いた。
- ・SMARTTM RACE cDNA增幅を用いて作成した5'-RACE Ready CHO cDNAおよび3'-RACE Ready CHO cDNAは、国立感染症研究所・細胞化学部(現・九州大学理学系大学院)の久下理博士から分与されたもの用いた。
- ・ライセニンは、全薬工業株式会社の関沢良之博士から分与されたもの用いた。
- ・(1R, 3R) N-(3-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-フェニルプロル)ドデカンアミド[(1R, 3R) HPA-12]は、東京大学大学院薬学系研究科の小林修教授から分与されたもの用いた。
- ・CHO細胞cDNAライブラリーは、CHO-K1細胞由来のmRNAから、インビトロゲン社のスーパースクリプト(SuperScriptTM)プラスミドシステムを用いて作成したものを用いた。
- ・PBS/nFLベクターは、pBS由来の改変ベクターであり、アミノ末端にFLAGTMエピトープ配列が付加できるようなマルチクローニング部位を持つように、本発明者が、pBSベクターから作成したものを用いたが、以下に詳述するPBS/nFLベクターを用いて行う実験操作は、pBSベクターを用いて行うことも可能である。

<実施例で使用した分析機器>

- ・PCR機器とDNA配列解析機器には、アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)社製のジーンアンプ(登録商標名GeneAmp)PCRシステム2700とABI PRIZM™ 310を用いた。
- ・TLCなどで分離した放射性物質のイメージ解析には、富士フィルム社のBAS 2000イメージアナライザーを用いた。
- ・液体シンチレーションカウンターはアロカ(Aloka)社のLSC-5100を、蛍光スペクトル測定装置には、日立製作所のモデルF-3000をそれぞれ用いた。
- ・蛍光顕微鏡にはカール・ツァイス社のアキシオバート(登録商標名Axiovert) S100 TVを、チャージド・カップルド・デバイス(charged coupled device; CCD)カメラには浜松ホトニクス社のデジタルCCDカメラC4742-95-12を使用した。

＜実験で用いたPCRプライマー＞

本実験で用いたPCRプライマーを表1に示す。

【0048】

【表1】

番号	配列番号	プライマー名	オリゴヌクレオチド配列
#1	9	pLIB (1470-1491)	5'-GCCCTCACTCCTTCTCTAGGCG-3'
#2	10	pLIB (1631-1605)	5'-CTTAAGCTAGCTGCCAAACCTACAGG-3'
#3	11	EcoRI/hCert	5'-CAGAATTACCATGTCGGATAATCAGAGCTGG-3'
#4	12	EcoRI/FL/hCert	5'-CAGAATTACCATGGACTACAAGGACGACGACAAAAA TGTGGATAATCAGAGCTGG-3'
#5	13	hCert/XhoI	5'-GGCTCGAGCTAGAACAAAATAGGCTTCCTGC-3'
#6	14	hCert/FL/XhoI	5'-GGCTCGAGCTATTGTCGTGTCCTGTAGTCGAAC AAAATAGGCTTCCTGC-3'
#7	15	d26ex/fusion-R	5'-CAGAGGCACTGACTAGATCAATGGAAGACATGGAGG AAGAGCGACTATAGGGCTTTGGACAAATCTATGTGTCC -3'
#8	16	d26ex/fusion-F	5'-CCATTGATCTAGTCAGTGCCTCTGATGATGTCACA GATTCACTCCCAGGTTGAAGAGATGGTGCAGAAC-3'
#9	17	EcoRI/dPH	5'-CAGAATTACCATGGAATCTGGATATGGATCTGAAT C-3'
#10	18	dSTART/XhoI	5'-GGCTCGAGCTATTGGACAAATCTATGTGTCCC-3'
#11	19	d760-1515vf	5'-CTCTTCAACCTTAGTCTTGCTGTTCAATGGC-3'
#12	20	d760-1515vs	5'-CAGCACAAAGACTAAGGTTGAAGAGATGGTGCAG-3'
#13	21	Hind3/Cert3-24	5'-CACAAGCTTCGGATAATCAGAGCTGGAAC-3'
#14	22	Cert351-331/Bgl2 XhoI	5'-GGCTCGAGCTAAGATCTAGTCTTGCTGTTCAATG GC-3'
#15	23	Hind3/Cert352-37 5	5'-CACAAGCTTCGGAATCTGGATATGGATCTGAATCC- 3'
#16	24	Cert1107-1087/Bg 12XhoI	5'-GGCTCGAGCTAAGATCTTGACAAATCTATGTGTC CC-3'
#17	25	Hind3/Cert1108-1 128	5'-CACAAGCTTCGAAGGTTGAAGAGATGGTGCAG-3'
#18	26	Cert1794-1774/Bg 12XhoI	5'-GGCTCGAGCTAAGATCTGAACAAAATAGGCTTCCT GC-3'
#19	27	mGP (h1196-1163)	5'-GAGAAAGTGTAGCAAGGATTCCAGCAGTAGTTGC-3
#20	28	cGP (984-1015)	5'-GAAGATGACTCCCTACAACTCGTTCTGATGG-3'
#21	29	EcoRI/CHOGPv	5'-TAGAATTCACTGGCGCAGCTCTCG-3'
#22	30	CHOGPv/XhoI	5'-GGCTCGAGGAATGTACACAGCCTTGC-3'
#23	31	CHOGP (1891-1911)	5'-AAGATCCCAGCCTGACTG-3'
#24	32	hCert/XhoI-GFP	5'-GGCTCGAGGAACAAAATAGGCTTCCTGC-3'

<細胞培養方法>

- CHO-K1細胞はアメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Cell Collection) から購入し、本発明者らによって継代、保存しているものを用いた。
- CHO細胞変異株・LY-A株は、本発明者ら (Hanada, K., Hara, T., Fukasawa, M., Yamaji, A., Umeda, M. and Nishijima, M. (1998) J. Biol. Chem. 273, 33787-33794.) が樹立したものを使用した。Kitamuraら (Gene Ther. 7, 1063-6., 2000) により樹立されたレトロウイルスパッケージング細胞であるPlat-E細胞は、その樹立者である東京大学・医学研究所・北村俊雄教授から分与されたものを使用した。

・CHO細胞は、Ham's F12培地に10%新生ウシ血清(NBS)とペニシリング(100単位/mL)および硫酸ストレプトマイシン(100μg/mL)を補充した細胞培養培地(F12/NBS)中、温度33℃において、5%のCO₂雰囲気で通常は培養した。Plat-E細胞の場合は、ダルベッコの最小必須培地に10%胎児血清(FBS)とペニシリング(100単位/mL)および硫酸ストレプトマイシン(100μg/mL)を補充した細胞培養培地(DMEM/FBS)中、温度37℃において、5%のCO₂雰囲気で培養した。

・また、ニュートリドーマ培地(1%ニュートリドーマSPおよび25μg/mLのゲンタマイシンを含有するHam's F12培地)もしくは、ニュートリドーマB0培地(ニュートリドーマ培地に10μMのオレイン酸ナトリウム・BSA複合体および0.1%のFBSを添加した培地)は、Hanadaら(J. Biol. Chem. 267, 23527-23533, 1992)によって調製されたものを、スフィンゴ脂質欠乏培地として用いた。

製造例

<本発明の薬剤の有効成分であるタンパク質の製造>

以下の手順でCERTタンパク質及びその組換えタンパク質を製造した。

<LY-A2株樹立の方法>

CHO細胞は、マウスレトロウイルス受容体であるマウス由来陽性アミノ酸輸送体(mCAT-1)が発現していないので、そのままではマウスレトロウイルスベクターを感染させることができない。そこで、LY-A株にmCAT-1 cDNAを安定発現させた株(LY-A2株と命名)を以下のように樹立した。先ず、Albritton, L.Mら(Cell 57, 659-66., 1989)に記載されるプラスミドpJET(米国・Brigham & Women's HospitalのJames Cunningham博士より供与されたもの)を、制限酵素Stu IおよびBam HIで処理して切り出したmCAT-1 cDNAを、哺乳動物細胞発現プラスミド・pcDNA3.1/Hyg(+)のEco RV/Bam HI部位に挿入してmCAT-1/pcDNA3.1/Hygを作成した。mCAT-1/pcDNA3.1/HygをBgl IIで処理して直線化した後、リポフェクタミン・プラス試薬を用いて、LY-A細胞に導入した。ハイグマイシンB(250 μg/mL)を添加したF12/NBS培地で培養し、ハイグマイシンB耐性細胞を選択した後、限外希釈法によって6つのハイグマイシンB耐性株を精製した。これらの株のmCAT-1発現レベルとその安定性を放射性アルギニン取り込みを指標にして検討し、最も安定的に発現する株をLY-A2株とした。放射性アルギニン取り込みアッセイ方法はWangら(J. Biol. Chem. 267, 23617-24., 1992)の方法に準じた。ただし、取り込み反応液は、25 mM ヘペス・KOH(pH 7.2)緩衝液に115 mM KC1、0.9 mM CaCl₂、0.81 mM MgSO₄、5 mM D-グルコースおよび0.1 mM L-[³H]アルギニン(1.25 μCi/mL)を添加したもの用い、反応は25°Cで30秒間行った。

<ヒトcDNAライプラリーを発現するレトロウイルス粒子の調製方法>

ヘラ(HeLa)細胞に由来するcDNAから構築されているレトロウイルスライプラリーのプラスミドを、フージーン・トランスフェクション試薬を用いて、パッケージング細胞であるP1at-E細胞に導入した。トランスフェクション処理開始の次の日に培地を交換し、さらに24時間培養後、培地を回収する。回収培地を、先ず、150 x gで5分間遠心し、その上清をついで1350 x gで5分間遠心した上清をウイルス粒子液とした。調製したウイルス粒子液-80°Cに冷凍保存し、使用直前に融解して感染実験に使用した。

<クローニングされたcDNAを発現するレトロウイルス粒子の調製方法>

発現したいcDNAをpLIBベクターに組み込んだプラスミドを、上述した方法と同様な方法で、Plat-E細胞へ導入し、ウイルス粒子液を調製した。緑蛍光タンパク質(GFP)を発現するためには、pLIB-EGFPをPlat-E細胞へ導入し、ウイルス粒子液を調製した。

<LY-A2細胞へのレトロウイルス感染方法>

感染実験の細胞培養に用いるNBSは、補体因子を失活させるために58°Cで30分間処理したものを使用した。2百万個のLY-A2細胞を100-mm直径培養皿に播種して、10 mL F12/NBS中、37°Cで一晩培養した。次の日、ヒトcDNAライプラリー発現レトロウイルス粒子液をF12/NBSで10倍希釈し、それに濾過滅菌したポリプレン(800 μg/mL PBS)を最終濃度4 μg/mLとなるように添加したものを感染培地とした。細胞の培養液を培養皿当たり5 mLの感染培地に交換して、37°Cで6時間培養した。培地を10 mLのF12/NBSに再び交換して、さらに一晩培養した。細胞をトリプシン処理で回収し、150-mm直径培養皿に一皿当たり2百

万細胞を播種した。10 mLのF12/NBS中、33°Cで一晩培養した後、次節のMCD選択に供した。なお、pLIB-EGFPベクターから調製したレトロウイルス粒子液を用いた予備実験から、ここで行った感染条件下では、約50%のLY-A2細胞が感染すると見積もられた。

<MCD耐性回復株を選択する方法>

ここで用いた機能回復株選択法は、SM含量の減少した細胞がコレステロール引き抜き試薬・メチルシクロデキストリン(MCD)に高感受性になり、SM含量が回復した細胞がMCDに対する耐性を回復するという知見をもとにして行った。前節で述べたように播種して33°Cで一晩培養した感染細胞を、10 mLの無血清F12培地で二回洗浄した後、25 mLの10 mM MCD/F-12(無血清F-12培地に溶かした10 mM MCDを濾過滅菌したもの)中、37°Cで一時間保温した。培養皿を12 mLのPBSで三回洗浄後、25 mLのF12/NBSを加えて33°Cで7~10日間培養した。生き残った細胞をトリプシン処理によって播種し、再び同様のMCD処理に供した。ただし、二度目以降のMCD処理では、細胞数が少ないので、細胞培養スケールを60-mm直径培養皿とした。総計4回のMCD処理をして生き残った細胞に関して、限外希釈を行って細胞を精製した。精製した細胞の中からMCD耐性、ライセニン感受性およびSM生合成がCHO-K1細胞でみられるレベルに回復している細胞株・LY-A2R細胞を得た。

<LY-A2R細胞に導入されているcDNAを増幅し、クローニングする方法>

LY-A2R細胞に導入されているcDNAをゲノミックPCRで増幅し、クローニングした。すなわち、LY-A2R細胞から調製したゲノムDNAをテンプレートとして、かつ、pLIBベクター中の配列に相当する合成オリゴヌクレオチド(表1のプライマー#1および#2)をプライマーとして、PCRを行った。増幅した約2.4キロ塩基ペア(kbp)のDNAを、pcDNA3.1/V5-His-TOPOベクターに挿入した。得られたプラスミドをLY-A細胞に、リポフェクタミンプラスを用いて導入すると、MCD耐性度がCHO-K1細胞レベルに回復する細胞が観察された。当該2.4 kbp DNAの配列を決定したところ、Raya, Aら (J. Biol. Chem. 275, 40392-9., 2000)によってすでに報告されているヒトGPBP△26タンパク質のcDNA配列 (GenBank番号：AF232930)と本質的に同一であることがわかった。本明細書にすでに詳述したように、この遺伝子産物の細胞内での機能はセラミド輸送であることが明らかになったので、発明者らは、GPBP△26タンパク質と本質的に同一の配列を有するタンパク質をCERTタンパク質と命名した。

<ヒトCERTの読み枠配列(open-reading frame, ORF)のクローニング方法>

ヒトCERTタンパク質のORFを以下の方法でクローニングした。クロンテック社製のヒト・ヘラ・レトロウイルスライプラリーをテンプレートとし、かつ、表1のプライマー#3及び#5を用いてPCRを行った。なお、前向きプライマーであるプライマー#3にはEco RI部位が、逆向きプライマーであるプライマー#5にはXho I部位がそれぞれ付加してある。増幅した約1.8 kbp DNAをEco RIとXho Iで処理後、pBSベクターのEco RI-Xho I部位に挿入してクローニングした。得られたプラスミドは、pBS/hCERTと名付けた。ここでクローニングしたcDNAの配列は、Raya, Aら (J. Biol. Chem. 275, 40392-9., 2000)によってすでに報告されているヒトGPBP△26タンパク質のORF配列 (GenBank番号：AF232930)と同一であることを確認した。

<ヒトCERT_LをコードするDNAの作成方法>

GPBP△26タンパク質(すなわち実質的にCERTタンパク質)の別スプライシング型として、78 bpのエキソンがさらに加わり、結果として26アミノ酸残基大きい産物であるGPBP(すなわち実質的にCERT_L)が様々な種類の細胞で発現していることが知られている。ヒトCERT_L(hCERT_L)に相当するORF配列を以下のように作成し、クローニングした。先ず、pBS/hCERTをテンプレートにし、かつ、表1に記載のプライマー#3と#7を用いてPCRを行い、約1.2 kbpの増幅DNAを得た。一方で、pBS/hCERTをテンプレートにし、かつ、表1に記載のプライマー#8と#5を用いてPCRを行い、約0.7 kbpの増幅DNAを得た。次に、これら1.2 kbpおよび0.7 kbp DNAを等モルで混合したものをテンプレートにし、かつ、表1に記載のプライマー#3と#7とを用いてPCRを行い、約1.9 kbpの増幅DNAを得た。この1.9 kbp DNAのEco RIとXho I処理産物をpBSベクターのEco RI-Xho I部位に挿入してクローニングしたプラスミドをpBS/hCERT_Lと名付けた。1.9 kbp DNAの配列は、すでにRaya,

Aら (J. Biol. Chem. 274, 12642-9, 1999) によって報告されているhGPBPタンパク質のORFの配列 (GenBank番号: AF136450) に一致していることを確認した。

<CERTの各種欠失変異体をコードするDNAの作成方法>

pBS/hCERTをテンプレートにし、かつ、表1に記載のプライマーを以下のように組み合わせてPCRを行い、CERTタンパク質の各種欠失変異体ORFをコードする増幅DNAを得た。PHドメイン欠失変異体(hCERT \triangle PHタンパク質)をコードする増幅DNAを得るために、プライマー#9と#5を、STARTドメイン欠失変異体(hCERT \triangle STタンパク質)をコードする増幅DNAを得るために、プライマー#3と#10をそれぞれ用いた。また、MRドメイン欠失変異体(hCERT \triangle MRタンパク質)をコードする増幅DNAを得るために、プライマー#3と#11を用いたPCRによる約350 bp産物と、プライマー#12と#5を用いたPCRによる約770 bp産物とをそれぞれ得た後、これらPCR産物DNAを等モルで混合したものをテンプレートにし、プライマー#3と#5を用いてPCRを行い、hCERT \triangle MRタンパク質をコードする約1.1 kbpの増幅DNAを得た。これら欠失変異体をコードするDNAは、Eco RIとXho I処理して、pBSベクターのEco RI-Xho I部位に挿入してクローニングした。PHドメインのみを持つ欠失変異体(PHhCERTタンパク質)をコードする増幅DNAを得るために、プライマー#13と#14を、MRドメインのみを持つ欠失変異体(MRhCERTタンパク質)をコードする増幅DNAを得るために、プライマー#15と#16を、STARTドメインのみを持つ欠失変異体(SThCERTタンパク質)をコードする増幅DNAを得るために、プライマー#17と#18を、それぞれ用いてPCR産物を得た。これらの増幅DNAのHind IIIとXho I処理産物をpBS/nFLベクターのHind III-Xho I部位に挿入してクローニングした。

<抗FLAG抗体で認識できるアミノ酸配列のhCERTタンパク質およびhCERT_Lタンパク質への付加方法>

抗FLAG抗体で認識できるAsp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys配列(FL配列)をCERTのアミノ末端に付加するために、pBS/hCERTをテンプレートにし、かつ、表1に記載のプライマー#4と#5を用いてPCRを行った。この増幅DNAのEco RIとXho I処理産物をpBSベクターのEco RI-Xho I部位に挿入してクローニングしたプラスミドをpBS/FL-hCERTと命名した。FL配列をCERT_Lのアミノ酸末端に付加の際には、テンプレートとしてpBS/hCERT_Lを用いて同様のPCRを行い、当該産物をクローニングしたプラスミドをpBS/FL-hCERT_Lと命名した。

<CERTタンパク質およびその関連タンパク質を哺乳動物で発現させるプラスミドの作成方法>

レトロウイルスベクター感染を介する発現のためには、pBSベクターのEco RI-Xho I部位にクローニングした各種DNAをEco RI-Xho I処理で切り出して、それらをレトロウイルス発現用pLIBベクターのEco RI-Sal I部位に挿入して得られたプラスミドを用いた。ヘラ細胞cDNAライブラリーからPCR増幅によってクローニングしたhCERTのORFをpLIBレトロウイルスベクターに挿入して、プラスミドpLIB/hCERTを得た。この方法は、CERTタンパク質の組換えタンパク質にも適用することができる。一方、リポフェクションを介する発現のためには、pBSベクターのEco RI-Xho I部位にクローニングした各種DNAをEco RI-Xho I処理で切り出したDNAを、pcDNA3.1/Neo(+)ベクターのEco RI-Xho I部位に挿入して得られたプラスミドを用いた。ヘラ細胞cDNAライブラリーからPCR増幅によってクローニングしたhCERTのORFをpcDNA3.1/Neo(+)ベクターに挿入して、プラスミドpcDNA3.1/hCERTを得た。

<MCDおよびライセニンに対する感受性の定量方法>

12穴培養皿の各穴当たりに10万個の細胞を1 mLのF12/NBS培地中に播種し、33°Cで一晩培養した。培養皿上の細胞を1 mLの無血清F12培地で2回洗浄後、1 mLの10 mM MCD/F12もしくはライセニン(25 ng/mL)/F12を添加した。なお、無血清F12のみを1 mL添加したものを対照とした。37°Cで1時間保温後、1 mLのリン酸緩衝生理的食塩水(PBS)で2回洗浄した。ついで、1 mLのMTT(0.5 mg/mL)/F12を添加して、37°Cで1時間保温した。生じた還元型MTTの相対量を文献Hanadaら (J. Biol. Chem. 273, 33787-33794., 1998) の方法で測定した。

<CERTタンパク質をコードする遺伝子のCHO細胞への導入方法および安定発現株の分離方法>

前節で作成したレトロウイルスベクター由来のウイルス粒子を感染させることで、当該遺伝子をLY-A2細胞に発現させた。すなわち、pLIB/hCERT由来のウイルス粒子をLY-A2に感染させ、当該遺伝子をLY-A2細胞に発現させた。hCERTを発現させた場合は、限外希釈法によって精製した形質転換株も分離し、この株をLY-A2/hCERTと命名した。4日間培養した後、上記した方法によりMCDおよびライセニンに対する感受性を調べた。対照として、cDNAを挿入していないpLIBベクター由来のウイルス粒子をLY-A2に感染させた細胞についてもMCDおよびライセニンに対する感受性を調べた。さらに、CHO-K1細胞についてもMCDおよびライセニンに対する感受性を調べた。MCDおよびライセニンに対する感受性測定の結果を図2に示す。

【0049】

また、前節で作成したpcDNA3.1/Neo(+)由来の発現プラスミドを、リポフェクタミンプラスを用いてLY-A細胞に導入し、当該遺伝子を発現させた。すなわち、pcDNA3.1/hCERT由来のウイルス粒子をLY-A2に感染させ、当該遺伝子をLY-A2細胞に発現させた。hCERTの安定発現株を精製するには、先ず、G418耐性細胞を選択し、それらを限外希釈法によって精製した。その後、上記した方法によりMCDおよびライセニンに対する感受性を調べ、MCD感受性が野生型レベルに回復しているものを分離した。この形質転換株はLY-A/hCERTと命名した。

【0050】

pLIB/hCERT由来のウイルス粒子を感染させたLY-A2細胞から、形質転換株を精製し、精製株であるLY-A2/hCERT細胞のMCDおよびライセニンに対する反応性をさらに詳細に調べた。結果を図3(A)に示す。

<細胞の各種リン脂質の含有量の決定方法>

F12/NBS培地20mL中に150-mm直径培養皿当たり 3×10^6 のCHO-K1細胞、LY-A2細胞、又はLY-A2/hCERT細胞を播種し、33℃で一晩培養した。無血清F12培地10mLで2回洗浄後、ニュートリドーマB0培地20mL中でさらに二日間培養した。PBSで洗浄後、細胞を搔取り法によって回収し、PBSに再懸濁し、Blighら(Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917, 1959)に記載の方法で脂質を抽出した。抽出した脂質は、クロロホルム/メタノール/酢酸/H₂O(容量比、25:15:4:2)を展開溶媒としたTLCを用いて分離した。TLCプレート上の分離リン脂質をヨード蒸気で呈色した後、各リン脂質をバンドをプレートから搔き出した。搔き出したリン脂質は、Rouserら(Lipids 1, 85-86., 1966)の方法によりリン含有量を測定することで定量した。結果を図3(B)に示す。

<[¹⁴C]セリンおよび[¹⁴C]コリンを用いた脂質の代謝標識実験方法>

CHO-K1細胞、LY-A2細胞、LY-A2/hCERT細胞をそれぞれF12/NBS培地5mL中に60-mm直径培養皿あたり 1.0×10^6 の細胞密度で播種し、33℃で一晩培養した。次いで、ニュートリドーマ培地1.5mLに培地交換し、[¹⁴C]セリン(0.75μCi)または[¹⁴C]コリン(1.0μCi)を加えた後、[¹⁴C]セリン添加の場合は2時間、[¹⁴C]コリン添加の場合は5時間33℃で培養した。ただし、(1R, 3R)HPA-12の影響を分析する場合、1μMの(1R, 3R)HPA-12を添加した(対照実験には、薬剤を溶かすのに用いたジメチルスルフォキシドを最終濃度0.01%と合わせるように添加した)ニュートリドーマ培地1.5mL中で4℃で15分間前処理した後、[¹⁴C]セリンを添加して、33℃において2時間培養した。細胞は冷却PBS2mLで2回洗浄後、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)900μLで溶解し、そして溶解物の800μLおよび20μLは、それぞれ、脂質抽出およびタンパク質濃度の決定に用いた。[¹⁴C]セリンで標識した脂質の分析のために、脂質は、酢酸メチル/n-ブロパノール/クロロホルム/メタノール/0.25%KC1(25:25:25:10:9, 容積比)を展開溶媒としたTLCを用いて分離した。[¹⁴C]コリンで標識した脂質の分析のために、脂質は、クロロホルム/メタノール/酢酸/H₂O(25:15:4:2, 容積比)を展開溶媒としたTLCを用いて分離した。プレート上で分離された放射性脂質は、イメージアナライザーで検出・解析した。[¹⁴C]セリンを用いた結果を図4(A)に、[¹⁴C]コリンを用いた結果

を図4(B)に示す。

<酵素活性測定方法>

SM合成酵素活性のアッセイは、Hanadaら (Biochim. Biophys. Acta 1086, 151-156., 1991) の方法により、C₆-NBD-Cerを基質として用いて実施した。ただし、CHO-K1細胞、LY-A2細胞、LY-A2/hCERT細胞からそれぞれ調製された膜画分を酵素源として用いた。結果を図5に示す。

<C₅-DMB-Cerを用いた細胞標識と蛍光顕微鏡観察の方法>

天然セラミドの小胞体(以下、ERとも述べる)からゴルジ体へのATP依存性輸送の活性は、蛍光性セラミド類似体であるC₅-DMB-CerのERからゴルジ体への再分配の解析から定性的に評価することができるなどを本発明者ら (K. J. Cell Biol. 144, 673-85., 1999) は、すでに明らかにしている。以下に詳述するように、ERを含む種々の細胞内器官膜のパルス標識のために細胞を4℃で、30分間C₅-DMB-Cerに曝し、洗浄後、33℃で、15分間蛍光顕微鏡で追跡した。C₅-DMB-Cerを用いた細胞標識と蛍光顕微鏡観察の方法は、それぞれYasudaら (J. Biol. Chem. 276, 43994-4002., 2001) の方法及びFukasawaら (J. Biol. Chem. 275, 34028-34034., 2000) の方法によって行った。すなわち、ガラス製カバーガラス上に生育したCHO-K1細胞、LY-A2細胞、LY-A2/hCERT細胞をそれぞれ、1μMのC₅-DMB-Cerを含むF12培地で、4℃で30分処理後、F12培地1mLで3回洗浄した。1mLのニュートリドーマ培地を加え、追跡をしない場合は、すぐにPBSで洗浄をし、一方、追跡をする場合は、33℃で15分間培養後にPBSで洗浄した。次に、0.125%グルタルアルデヒドのPBS溶液中で、4℃で、5分間で固定した。試料は、固定後直ちに蛍光顕微鏡下で観察およびデジタルCCDカメラ撮影した。結果を図6に示す。

【0051】

本発明者らは、さらに、セラミドがERからSM合成の場へと移動する輸送経路には、ATPに存性する経路と存性しない経路の少なくとも2種類があり、LY-A細胞では、ATP依存性輸送経路が欠損していることを本発明者らは、すでに明らかにしている。hCERTの導入で回復したセラミド輸送経路が、ATP依存性輸送経路であるか否かを調べるために、C₅-DMB-Cerの細胞内移動に対するATP枯渇の影響を解析した。なお、ATP枯渇条件を用いる場合には、F12培地1mLで3回洗浄した後に、エネルギー阻害剤(50mMデオキシグルコースと5mMアジ化ナトリウム)を添加した1mLのニュートリドーマ培地中、33℃で15分間前処理した後に、C₅-DMB-Cer処理してPBSで洗浄をして同様に固定して観察及び撮影を行った。また、追跡をする場合は、C₅-DMB-Cer処理した後に、さらにエネルギー阻害剤添加培地で33℃で15分間培養後にPBSで洗浄し、同様に固定して観察及び撮影を行った。結果を図7に示す。

<セラミド輸送阻害剤の影響>

ATP依存性セラミド輸送経路に対する選択性阻害剤・(1R,3R)HPA-12が、本発明者ら (J. Biol. Chem. 276, 43994-4002., 2001) によってすでに発見されている。hCERTの導入で回復したセラミド輸送経路が、(1R,3R)HPA-12感受性の輸送経路であるか否かを調べるために、SM生合成に対する(1R,3R)HPA-12処理の影響を放射性セリンを用いた脂質代謝標識実験によって解析した。結果を図8に示す。

<hCERT発現によるLY-A細胞のセラミド輸送機能の回復>

レトロウイルス受容体を導入していない元来のLY-A細胞においてもhCERT発現によってセラミド輸送機能が回復することを以下に述べるようにして確かめた。hCERTを挿入したpCDNA3.1/NeoプラスミドをLY-A細胞にリポフェクションで導入し、G418耐性細胞を選択後、限外希釈によって、形質転換株・LY-A/hCERTを精製した。その後、MCDに対する感受性の測定、[¹⁴C]セリンおよび[¹⁴C]コリンを用いた脂質の代謝標識実験、及びC₅-DMB-Cerを用いた細胞標識と蛍光顕微鏡観察を同様に行った。結果をそれぞれ図9(A)～(C)に示す。

<LY-A細胞の欠損はhCERT発現によっても相補することの証拠>

CERTタンパク質及び26アミノ酸残基大きな別スプライシング型産物であるCERTLタン

パク質がLY-A細胞の欠損を相補するか否かを検証した。アミノ末端にFL配列を付加したCE RT タンパク質及びCERT_Lタンパク質を発現するためのレトロウイルスをそれぞれLY-A2細胞に感染させた。得られた (LY-A2+FL-hCERT) 細胞及び (LY-A2+FL-hCERT_L) 細胞のMCD耐性を<MCD耐性回復株を選択する方法>に記載される方法に準じて生き残った細胞数を数えることによって測定した。また、遺伝子を挿入していないpLIBベクターを用いてLY-A2細胞を感染させて得られた (LY-A2 + 空ベクター) 細胞、CHO-K1細胞、LY-A2細胞も同様にMCD耐性を測定した。結果を図10 (A) に示す。

<抗FLAG抗体または抗GFP抗体を用いたウエスタンプロット解析方法>

細胞破碎液の調製およびウエスタンプロットの方法は、それぞれHanadaら (J. Biol. Chem. 273, 33787-33794., 1998) の方法およびBejaouiら (J. Clin. Invest. 110, 1301-1308., 2002) の方法に準じた。すなわち、冷却PBSで洗浄した (LY-A2+FL-hCERT) 細胞、(LY-A2+FL-hCERT_L) 細胞、及び (LY-A2 + 空ベクター) 細胞をそれぞれ搔取り法によって回収し、HSEI緩衝液[10 mMペプス-NaOH緩衝液(pH 7.5)に250 mMスクロース、1 mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、およびプロテアーゼ阻害剤カクテルを添加したもの]に懸濁後、投げ込み式超音波発生器を用いた超音波処理によって、細胞を破碎した。この破碎液を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、PVDF膜に転写した。この転写膜に対して、プロッキング処理、第一次抗体処理および洗浄処理、第二次抗体処理および洗浄処理、そしてECL処理を施し、免疫学的反応蛋白質を検出した。GFPまたはGFP融・ERTタンパク質を検出する目的にはBD Living ColorsTM A.v. モノクローナル抗体を、それぞれ第一次抗体として用いた。第二次抗体としてはHRP結合ヤギ抗マウス免疫グロブリンGを用いた。結果を図10 (B) に示す。

<CHO-K1細胞由来CERTタンパク質のcDNAクローニング方法>

CHO-K1細胞由来CERTタンパク質のcDNAをクロントック社SMART RACE cDNA 増幅キットを用いて、cDNA末端の迅速増幅(rapid amplification of cDNA ends; RACE)を行うことでクローニングした。すなわち、当該キットで作成した5' -RACE Ready CHO cDNAをテンプレートとし、表1に記載のプライマー# 1 9を遺伝子特異的プライマーとして、PCRを行った。この際、DNAポリメラーゼとしてパイロベストDNAポリメラーゼを用いた。一方で、3' -RACE Ready CHO cDNAをテンプレートとし、表1のプライマー# 2 0を遺伝子特異的プライマーとしてPCRを行った。これら5' -RACE反応および3' -RACE反応によって、それぞれ約1.2 kbpおよび約1.4 kbpの増幅差物を得た。これら産物をpCR-Blunt II-TOP0ベクターにクローニング後、DNA配列を決定した。決定した配列中の重複領域を鑑み、CHO-K1細胞由来CERT (cCERT) のcDNA全長の配列2473 bpを決定した。次に、cCERTの完全なORFを含むDNAを得るために、CHO細胞cDNAライブラリーをテンプレートとし、かつ、表1に記載のプライマー# 2 1と# 2 2を用いてPCRを行った。増幅した約1.9 kbpのDNAをEco RIおよびXho Iで処理し、pBSベクターのEco RI-Xho I部位に挿入したプラスミドをpBS/cCERTと名付けた。

<CHO細胞由来CERTタンパク質のノザンプロット解析の方法>

CHO-K1細胞およびLY-A細胞から総RNAをイソゲン(isogen; 日本ジーン社製)を用いて調製した。また、プローブとしては、上述のcCERT 5' -RACEで得た約1.2 kbp DNAを、[α -³²P]dCTPおよびメガプライムDNAラベリングキットを用いて³²P標識したものを使用した。ハイブリダイズ後の洗浄条件はストリンジェント(stringent)条件で行った。転写膜上の放射性パターンの解析はBAS 2000イメージアナライザを用いて行った。また、内部標準のための転写膜再プロープ実験は、和光純薬工業から購入したβアクチンDNA断片を³²P標識したものをプロープとして行った。結果を図11に示す。

<LY-A細胞由来のcCERT ORFのクローニング方法>

LY-A細胞から総RNAをイソゲンを用いて調製した。次に、このRNAから、スーパースクリプト第1鎖合成システムを用いてcDNAを調製した。次に、本cDNAをテンプレートとし、かつ、表1に記載のプライマー# 2 1と# 2 2を用いてPCRを行った。増幅した約1.9 kbpのDNAをEco RIおよびXho Iで処理し、pBSベクターのEco RI-Xho I部位に挿入したプラスミドをpBS/cCERT(G67E)と名付けた。以下に記載するように、LY-A細胞由来のcCERTには、6

7番目のグリシン残基がグルタミン酸に置き換わるミスセンス変異が起こっていることがわかったので、このタンパク質をcCERT(G67E)と命名した。

<CHO-K1細胞またはLY-A細胞に由来するCERTのカルボキシル末端へのFL配列付加方法>

抗FLAG抗体で認識できるFL配列をcCERTのカルボキシル末端に付加するために、pBS/cCERT-RTをテンプレートにし、かつ、表1に記載のプライマー#23と#6を用いてPCRを行った。この増幅産物をCla IとXho Iとで処理して得られる約300 bp DNAを精製した。そして、pBS/cCERTおよびpBS/cCERT(G67E)をCla IとXho Iとで処理して得られる約3.7 kbp DNAに、先に精製した約300 bp DNAを挿入することで、カルボキシル末端にFL配列が付加したCERTをコードするDNAを作成し、pBS上にクローニングした。配列を確認後、クローニングしたDNAをpLIBベクターにも移した。

【0052】

また、cCERTおよびcCERT(G67E)のFL配列付加型(それぞれ、cCERT-FLおよびcCERT(G67E)-FLと命名)をコードするcDNAをレトロウイルスベクターを介して、LY-A2細胞に導入した(LY-A2+cCERT-FL)細胞及び(LY-A2+cCERT(G67E)-FL)細胞、MCD耐性を<MCD耐性回復株を選択する方法>に記載される方法に準じて生き残った細胞数を数えることによって測定し、LY-A2細胞の性質が野生型に回復するか否かを解析した。結果を図12(A)に示す。さらに、cCERT-FL配列及びcCERT(G67E)-FL配列に対して、<抗FLAG抗体または抗GFP抗体を用いたウエスタンプロット解析方法>と同様にウエスタンプロット解析を行った。ただし、FL配列付加CERTタンパク質を検出する目的には抗FLAG M2モノクローナル抗体を用いた。結果を図12(B)に示す。

<GFP融・)ERT発現プラスミドの作成方法>

hCERT、cCERTおよびcCERT(G67E)のカルボキシル末端にGFPを付加した融合蛋白質を発現するためのプラスミドを以下のように作成した。pBS/hCERT、pBS/cCERTまたはpBS/cCERT(G67E)をテンプレートにし、かつ、表1に記載のプライマー#3と#24を用いてPCRを行った。増幅した約1.9 kbpのDNAをEco RIおよびXho Iで処理し、pBSベクターのEco RI-Xho I部位に挿入してクローニングした後、塩基配列を確認した。そして、これらクローニングしたDNAをEco RIとXho Iとで処理して切り出し、pEGFP-N3ベクターのEco RI-Sal I部位に挿入した。このように作成したCERT-GFP融合蛋白質発現プラスミドは、それぞれphCERT-GFP、pcCERT-GFP、pcCERT(G67E)-GFPなどと系統的に命名した。なお、プライマー#3と#24の塩基配列はhCERTのDNA配列を基にして設計しており、cCERTの当該部分のDNA配列とは部分的に異なっている。しかし、当該部分のアミノ酸配列はhCERTとcCERTとの間で同一であり、かつ、これらプライマーはcCERTに対するPCRにおいても有効であったので使用した。

<CHO細胞におけるGFPおよびGFP融・)ERTの発現方法>

pEGFP-N3、phCERT-GFP、pcCERT-GFPまたはpcCERT(G67E)-GFPプラスミドを、フージーンを用いて、CHO-K1細胞に導入した。得られた細胞を(CHO-K1+pEGFP-N3)細胞、(CHO-K1+phCERT-GFP)細胞、(CHO-K1+pcCERT-GFP)細胞、(CHO-K1+pcCERT(G67E)-GFP)細胞と命名した。DNA導入開始から24時間培養後に播種し直し、さらに二日培養後に、蛍光観察もしくは細胞破碎液調製に供した。

<(CHO-K1+pEGFP-N3)細胞、(CHO-K1+pcCERT-GFP)細胞、(CHO-K1+pcCERT(G67E)-GFP)細胞に発現したGFPまたはGFP融・)ERTとゴルジ体局在マーカーとの共局在解析方法>

CERT融・)FPを一過的に発現した(CHO-K1+pEGFP-N3)細胞、(CHO-K1+pcCERT-GFP)細胞、(CHO-K1+pcCERT(G67E)-GFP)細胞において、ゴルジ体に局在するGS28蛋白質に対する抗体を用いた間接免疫細胞染色を行い、GFPとGS28の細胞内分布を比較した。免疫細胞化学的手法は、Yasudaら(J. Biol. Chem. 278, 4176-4183., 2003)の方法に準じた。すなわち、カバーガラス上での培養した細胞に対して、3.7%ホルムアルデヒド固定処理、0.1 M塩化アンモニア処理、0.2%トリトンX-100処理、ブロッキング処理、一次抗体処理と洗浄、そして二次抗体処理と洗浄を施した後、スライドガラス上へマウントし、蛍光顕微鏡観察した。ただし、一次抗体にはマウス抗G28モノクローナル抗体を、二次抗体にはアレキサフルオロ594ヤギ抗マウス免疫グロブリンGを使用した。結果を図13(A)に示す

。<抗FLAG抗体または抗GFP抗体を用いたウエスタンプロット解析方法>

細胞破碎液の調製およびウエスタンプロットの方法は、それぞれHanadaら (J. Biol. Chem. 273, 33787-33794., 1998) の方法およびBejaouiら (J. Clin. Invest. 110, 1301-1308., 2002) の方法に準じた。すなわち、冷却PBSで洗浄した細胞を搔取り法によって回収し、HSEI緩衝液[10 mMヘペス-NaOH緩衝液(pH 7.5)に250 mMスクロース、1 mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、およびプロテアーゼ阻害剤カクテルを添加したもの]に懸濁後、投げ込み式超音波発生器を用いた超音波処理によって、細胞を破碎した。この破碎液を、SDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動に供し、PVDF膜に転写した。この転写膜に対して、ブロッキング処理、第一次抗体処理および洗浄処理、第二次抗体処理および洗浄処理、そしてECL処理を施し、免疫学的反応蛋白質を検出した。ただし、FL配列付加CERTを検出する目的には抗FLAG M2モノクローナル抗体を、GFPまたはGFP融・ERTを検出する目的にはBD Living ColorsTM A.v. モノクローナル抗体を、それぞれ第一次抗体として用いた。第二次抗体としてはHRP結合ヤギ抗マウス免疫グロブリンGを用いた。結果を図13 (B) に示す。

<ヒスチジンタグ配列が付加したhCERTタンパク質およびその関連タンパク質の大腸菌発現用ベクターの作成>

ヒスチジンタグ配列が付加したhCERTタンパク質およびその関連タンパク質を大腸菌で発現させるために、本願明細書の段落番号0064～0066で作成・クローニングしたDNA断片をpET28a(+)ベクターのマルチクローニング部位にインフレームになるように移したプラスミドを作成した。すなわち、pBSベクターにクローニングしたhCERT, hCERT_L, hCERT_{PH}, hCERT_{MR}, およびhCERT_{ST}は、Eco RI-Xho I処理で回収し、pET-28a(+)のEco RI-Xho I部位に挿入した。一方、pBS/nFLにクローニングしたPHhCERT, MRhCERTおよびSThCERTは、Hind III-Xho I処理で回収し、pET-28a(+)のHind III-Xho I部位に挿入した。

<組換え大腸菌からのhCERTの精製方法>

hCERTタンパク質およびその関連タンパク質(hCERTタンパク質, hCERT_Lタンパク質, hCERT_{PH}タンパク質, hCERT_{MR}タンパク質, およびhCERT_{ST}タンパク質、並びにPHhCERTタンパク質, MRhCERTタンパク質およびSThCERTタンパク質)をコードするDNAを組み込んだpET-28a(+)プラスミドをヒートショック法により大腸菌BL21(DE3)株に導入し、カナマイシンに対する耐性菌として形質転換させた。形質転換細胞をルリア・ブロース培地中、細胞濁度が波長600 nmにおける吸光度で0.6に達するまで37℃で培養した。吸光度0.6に達した時点で、IPTG (イソプロピル-1-チオ-b-D-ガラクトピラノシド)を終濃度250 μMになるように加え、更に25℃で一晩培養した。培養液を遠心し、沈降した大腸菌を破碎用の緩衝液 {25 mM トリス(pH7.4)、1% トリトンX-100、1 mM オルトバナジン酸、50 mM フッ化ナトリウム、5 mM ピロリン酸ナトリウム、2.5 mM 2メルカプトエタノール、0.27 M スクロース、及びプロテアーゼ阻害剤混合物(ロッシュ#1873580)1錠/50 ml} に懸濁したのち、投げ込み式超音波発生器を用いて菌を破碎した。これを10万gで1時間遠心し、上清画分を精製に用いた。精製にはクロントック社のTALON (コバルトイオンキレート樹脂) を用いた。TALONによる精製はマニュアルに従った。150 mMのイミダゾールで溶出した目的タンパクを一晩透析し、10 mM トリス(pH 7.4), 250 mM スクロースからなる緩衝液、または10 mM トリス(pH 7.4), 150 mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に置換したのち、-80℃で保存した。CERTは、図1に示すように、アミノ末端約100アミノ酸領域にプレクストリンホモロジー(PH)ドメインを、カルボキシル末端約250アミノ酸領域にステロイドジェック急性制御タンパク質関連脂質転移(steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer; START)ドメインを、それらの中間領域(middle region, MR)のドメインと大きく3つのドメインを持っていると示唆されている。そこで、各ドメインのみを欠いた、hCERT_{PH}タンパク質, hCERT_{MR}タンパク質、およびhCERT_{ST}タンパク質、及び、各ドメインのみを有するPHhCERTタンパク質, MRhCERTタンパク質およびSThCERTタンパク質もアミノ酸配列を解析した。さらに、hCERTのMRドメインの最後に26アミノ酸が挿入された構造をしているhCERT_Lタンパク質に相当する組換え体も調製し、アミ

ノ酸配列を解析した。hCERTタンパク質の配列を配列番号1のアミノ酸配列として示す。各ドメインのみを欠いたタンパク質であるhCERT \triangle PHタンパク質、hCERT \triangle MRタンパク質およびhCERT \triangle STタンパク質、及び、各ドメインのみを有するPHhCERTタンパク質、MRhCERTタンパク質およびSThCERTタンパク質の構造を図1に示されている。また、hCERT_Lタンパク質の配列を配列番号2のアミノ酸配列として示す。以上のように、本発明の薬剤に用いるタンパク質を製造し、以下の実施例において用いた。

【0053】

図2～図13において以下のが判明した。図2に示すように、pLIB/hCERT由来のウイルス粒子感染によって、LY-A2は、有意にMCD耐性およびライセニン感受性を獲得したが、一方、pLIBベクター由来のウイルス粒子感染では、そのような変化は全く起らなかった。この結果から、hCERTの発現によって、LY-A2のMCDおよびライセニンに対する反応性が野生型に似た性質に変化することが示された。

【0054】

図3（A）で示すように、精製株であるLY-A2/hCERT細胞のMCDおよびライセニンに対する反応性は、野生型CHO-K1細胞でみられる反応性とほぼ同じレベルであった。さらに、図3（B）に示されるように、細胞の含有する各リン脂質を化学的に定量したところ、LY-A2/hCERT細胞においては、SM含有量も野生型レベルに回復していた。また、図4（A）で示すように、放射性セリンを用いた脂質代謝標識実験を行うと、SM生合成速度もLY-A2/hCERT細胞では野生型レベルに回復していた。これらの結果から、LY-A2におけるSM生合成の低下は、hCERTの安定発現によってほぼ完全に野生型レベルへと回復することが明らかとなつた。

＜LY-A2細胞におけるSM合成回復は、SM合成酵素活性やPC生合成の増進ではないことの証拠＞

図4（B）に示されるように、SMはホスファチジルコリン（PC）からセラミドへのホスホコリンの転移により合成され、該反応はSM合成酵素により触媒される。放射性コリンを用いた脂質代謝標識実験においても、LY-A2/hCERT細胞のSM生合成速度は野生型レベルに回復しており、またPC合成速度も野生株レベルであった。図5に示されるように、SM合成酵素の活性は、LY-A2/hCERT、LY-A2、CHO-K1細胞間で差はなかった。これらの結果から、LY-A2細胞におけるSM合成回復は、SM合成酵素活性やPC合成の増進によるものではないことが示された。

＜生きた細胞におけるC₅-DMB-CerのERからゴルジ体への再分配＞

図6に示されるように、LY-A2/hCERT、LY-A2、CHO-K1細胞は、追跡前は、本質的に同じ細胞内DMB蛍光のパターンを示し、それは細胞内器官膜の全体にほぼ均一に分布していた。一方、標識細胞を追跡したとき、LY-A2細胞におけるゴルジ体領域へのDMB蛍光の蓄積はCHO-K1細胞に比べて明らかに低かったが、LY-A2/hCERTではCHO-K1細胞に匹敵する蓄積が観察された。

【0055】

図7に示されるように、エネルギー阻害剤（50mMのデオキシードグルコースおよび5mMのNa₃N）処理によって細胞内ATPを枯渇した条件下では、ERからゴルジ体領域へのDMB蛍光の移動は、CHO-K1細胞においてと同様にLY-A2細胞でも阻害された。これらの結果から、LY-A2細胞で欠損しているATP依存性のER-ゴルジ体間セラミド輸送は、hCERTの安定発現によってほぼ完全に回復されることが明らかとなった。

【0056】

図8に示すように、1μMのHPA-12は、CHO-K1細胞においてと同様にLY-A2細胞でもSM合成を顕著に阻害した。(1R,3R)HPA-12感受性輸送経路が欠損しているLY-A2細胞では、(1R,3R)HPA-12無処理でもSM生合成が低下しており、本薬剤処理をしてもさらなる阻害はみられなかった。これらの結果から、hCERTの導入で回復したセラミド輸送経路は(1R,3R)HPA-12感受性経路であることが明らかとなった。

【0057】

図9に示すように、MCDに対する反応性、SM生合成、C₅-DMB-CerのERからゴルジ体領域

への移動、それら全ての指標において、LY-A/hCERT細胞は野生型の性質に回復していた。
【0058】

図10 (A) に示すように、hCERTよりも26アミノ酸残基大きな別スプライシング型産物・hCERT_LがLY-A細胞の欠損を相補するか否かを検証した。アミノ末端にFL配列を付加したhCERT (FL-hCERT) もしくはhCERT_L (FL-hCERT_L) を発現するためのレトロウイルスをLY-A2細胞に感染させた場合、有意にMCD耐性を獲得したが、一方、空ベクター由来のウイルス粒子感染では、そのような変化は起こらなかった。図10 (B) に示すように、FL配列に対するウエスタンプロット解析によると、FL-hCERTとFL-hCERT_Lの導入発現効率がほぼ等しかった。これらの結果から、hCERT_Lは、hCERTと同様に、LY-A細胞の欠損を相補する能力があることが明らかとなった。

<CHO-K1細胞由来CERT cDNAの配列解析>

CHO-K1細胞由来CERT mRNAに対する全長cDNAの配列をRACEなどによって決定した。全長2473 bpの配列は、598アミノ酸の産物(cCERT)をコードする1794 bpのORFを含んでいた(配列表3および7)。CERTは、ヒト、マウス、およびチャイニーズハムスターの全てで598アミノ酸であり、また、cCERTとhCERTとの間には、DNA配列レベルで約90%、アミノ酸レベルで約98%の同一性があった。この結果は、CERTの哺乳動物間での強い保存性を示している。また、CHO細胞由来のcDNAライブライマーから、hCERT_Lの相同タンパク質(cCERT_Lと命名)をコードするORFもPCRで増幅された(配列表4および8)。hCERT_LとhCERTとの関係に同じく、cCERT_LはcCERTよりも26アミノ酸大きな産物である。

<CHO細胞CERTのノザンプロット解析>

図11に示すように、CHO-K1細胞とLY-A細胞の間にCERT mRNA発現に差があるか否かを調べる目的で、ノザンプロット解析を行った。CERTプローブにハイブリダイズする3つの異なる分子量(それぞれ、約1.2, 2.6, 5.5キロ塩基)RNAが検出され、いずれの発現レベルもCHO-K1細胞とLY-A細胞の間に有意の差はなかった。CHO-K1細胞からクローニングしたCERT全長cDNAは2473 bpであったので、ノザンプロット解析で検出された約2.6キロ塩基)RNAがおそらくCERT全長cDNAに対応するmRNAであると考えられる。他の1.2および5.5キロ塩基RNAは、スプライスアイソフォームまたは未成熟型CERT mRNAであるのかもしれない。内部対照を得る目的で、βアクチンDNAをプローブとして用いた再ハイブリダイズを行い、アクチンmRNAレベルが両細胞RNAサンプル間で等しいことも確認した。

<LY-A細胞由来CERT cDNAの配列解析>

前節で示したように、LY-A細胞においてもCERT mRNAが発現していることを見出した。そこで、逆転写PCRによって、LY-A細胞からCERT cDNAをクローニングした。LY-A細胞のCERT cDNAは、CHO-K1細胞由来配列と比較した場合、唯一の変異を有していることが明らかとなった。この変異は、ORFの67番目のコドンがGGAからGAAに変わる一塩基置換であり、結果としてcCERTタンパク質の67番目のグリシン残基がグルタミン酸残基へと置換するミスセンス変異であった。そこで、このORF産物をcCERT(G67E)と命名した。なお、本実験において、PCRは独立に2回行い、同一の配列を得た。よって、先述したミスセンス変異はPCRによる人工的な変異ではない。

<LY-A2細胞におけるcCERTもしくはcCERT(G67E)のcDNA導入発現効果>

図12 (A) に示すように、LY-A2にcCERT-FL cDNAを導入した場合、明らかなMCD耐性回復が起こったが、それらのG67E変異型を導入した場合は、そのような回復は起こらなかった。FL配列を付加していないcCERTおよびcCERT(G67E)のcDNAを導入して場合でも同様な結果が得られた(データ未表示)。また、図12 (B) に示すように、FL配列に対するウエスタンプロット解析における、cCERT-FLとcCERT(G67E)-FLの発現レベルがほぼ等しいことが示された。よって、cCERT(G67E)発現レベルがcCERT発現レベルに比べて低いために機能回復能が低いという可能性は否定された。これらの結果から、LY-A細胞の欠損は、野生型cCERTの発現により相補されること、cCERTの当該相補機能はG67E変異によって損なわれることが明らかとなった。

【0059】

なお、図10 (B) および図12 (B) に示したウエスタンプロット解析結果において

、CERTが二重バンドとして観察されるのは、本蛋白質のリン酸化のためと考えられる。実際、脱リン酸化処理を行うと二重バンドのうち高分子量のほうのバンドは消失した。

<CERTの細胞内分布に対するG67E変異の影響>

図13 (A) に示されるように、cCERT-GFPを発現させた場合、これらの緑色蛍光は細胞質にも分布するが、核周辺領域に明らかに濃縮していた。この核周辺領域は、GS28局在領域と一致していることから、ゴルジ体であると考えられる。一方、cCERT(G67E)-GFPを発現させた場合、その緑色蛍光の分布は、細胞質にほぼ均一に分布し、GS28局在領域へ選択的に濃縮しなかった。また、CERTと融合していないGFPを発現させた場合、細胞質だけでなく核にも多く分布した。なお、図13 (B) に示される抗GFP抗体を用いたウエスタンプロット解析から、cCERT-GFPやcCERT(G67E)-GFPは予想された分子量の産物として発現され、GFP抗体に交差する分解産物は検出されなかった。よって、これらGFP融合タンパク質発現時に観察されたGFP蛍光分布は、cCERT-GFPもしくはcCERT(G67E)-GFPそのものの分布を反映している。これらの結果から、CERTは、細胞質とゴルジ体に主に分布すること、CERTのゴルジ体会合能はG67E変異で損なわれること、G67E変異はCERTが核から除外される性質には影響しないこと、が明らかとなった。

【0060】

LY-A株にhCERT cDNAを導入するとSM合成が野生株レベルに回復した。また、蛍光性セラミド類似体を用いたアッセイによって、小胞体からゴルジ体へのセラミド移動が回復することも明らかとなった。別スプライシング型に相当するhCERT_L cDNAもLY-A株を回復させた。よってCERTタンパク質は、細胞内セラミド選別輸送に関わる因子である。

【0061】

以上の結果から、(1) CERTタンパク質は、セラミド輸送に欠損を持つLY-A細胞の機能回復探索法でcDNAライブラリーから選択されてきたこと、(2) CERTタンパク質は、LY-A細胞の知られている限り全ての欠損を相補すること、(3) LY-A細胞では自身のCERTタンパク質をコードする遺伝子にミスセンス変異が起こっていること、(4) LY-A細胞で起こっている変異を持つCERTタンパク質は、LY-A細胞の欠損相補能を損なっていることを明示している。従って、これらの結果から、当該CERTタンパク質をコードする遺伝子における変異がLY-A細胞の欠損の原因変異であること、および、CERTが細胞内セラミド選別輸送に特異的に関わる因子であるが初めて明らかとなった。

【実施例1】

【0062】

<hCERTタンパク質、hCERT_Lタンパク質及びその組換えタンパク質>

次に、hCERTタンパク質及びその組換えタンパク質 (hCERTタンパク質、hCERT_Lタンパク質、hCERT_{△PH}タンパク質、hCERT_{△MR}タンパク質、およびhCERT_{△ST}タンパク質、並びにPH hCERTタンパク質、MRhCERTタンパク質およびSThCERTタンパク質) が脂質膜からセラミドを遊離させる活性を示すか否かを検討した。このアッセイには、<ヒスチジンタグ配列が付加したhCERTタンパク質およびその関連タンパク質の大腸菌発現用ベクターの作成>及び<組換え大腸菌からのhCERTの精製方法>において、上記したように大腸菌で発現させたCERTタンパク質及びその組換えタンパク質 (hCERTタンパク質、hCERT_Lタンパク質、hCERT_{△PH}タンパク質、hCERT_{△MR}タンパク質、hCERT_{△ST}タンパク質、並びにPHhCERTタンパク質、MRhCERTタンパク質およびSThCERTタンパク質) を精製して使用した。

<膜からのセラミド遊離促進活性の検出方法>

以下に標準的な方法の詳細を記載するが、記載した条件を変更しても、原理的に遊離セラミドを遠心法で分離する手段を有するセラミド遊離促進活性の検出方法は、本発明に属する。セラミド含有脂質膜は、卵黄由来のホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの4:1からなる混合脂質をベースとして、1サンプル当たり12.5 nCi (225 pmol) の[パルミトイル-1-¹⁴C] N-パルミトイル-D-エリスロ-スフィンゴシン (以下¹⁴C-セラミドと述べることがある) を含み、濃度が2.5 mg/mlになるように調製した。この脂質膜が活性測定1サンプル当たり20 μL必要である。活性測定に必要な量の脂質をエッペンドルフチューブに分取したのち、窒素を吹き付けて乾固させた。乾固した脂質膜に濃

度が2.5 mg/mLになるように、緩衝液1[50 mM NaClおよび1 mM EDTAを添加した20 mMヘペス-NaOH緩衝液(pH 7.4)]を加えた後、浴槽型超音波発生器[ブランソン(Branson)社製モデル2210]を用いて穏やかに超音波処理した。超音波処理は25℃で行い、3分間の超音波処理、30秒間のボルテックス、3分間の超音波処理、という手順で行った。このようにして調製した脂質膜をセラミド遊離実験に用いた。脂質膜からのセラミドの遊離反応とその検出は以下のように行った。

【0063】

対象とするタンパク質試料として上記したhCERTタンパク質又はその組換えタンパク質それぞれ(標準条件では、供与膜中セラミドの2倍モル等量に当たる450ピコモル相当のタンパク質を使用)を、緩衝液2[100 mM NaClおよび0.5 mM EDTAを添加した50 mMヘペス-NaOH緩衝液(pH 7.4)]を用いて30 μLにメスアップした。ここにセラミド含有脂質膜を20 μL加えて反応を開始した。最終的なリン脂質の濃度は1 mg/mLになり、セラミドは全リン脂質量に比して約0.3%含まれている。これらの混合物を37℃で30分間保温した後、50,000 × gで30分間遠心し(遠心機、日立工機社製himac CS120EX; 遠心ロータ、RP100AT3-200; 遠心チューブ、0.23PCチューブ)、脂質膜を沈降させた。組み換え大腸菌から精製してきたhCERTタンパク質及び組換えタンパク質を用いた場合、この遠心条件では大部分のタンパク質が上清に残るので、¹⁴C-セラミドがhCERTタンパク質に結合すると、脂質膜から遊離して上清画分に移行する。上清画分の¹⁴Cの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することにより、hCERTによるセラミドの遊離を促進する活性を算出した。hCERTタンパク質を用いたセラミドの遊離を促進する活性の測定結果を図14(A)及び(B)に示す。膜小胞からの遊離反応アッセイにおける基質をセラミドから様々な他の脂質に変えて、反応の特異性を調べた。この際、hCERTとSTARTドメイン欠失hCERTとの差を、STARTドメインを介する脂質引き抜き活性の指標とした。結果を図15に示す。さらに、hCERTタンパク質、hCERT_Lタンパク質、hCERT△PHタンパク質、hCERT△MRタンパク質、およびhCERT△STタンパク質、並びにPHhCERTタンパク質、MRhCERTタンパク質およびSThCERTタンパク質によるセラミドの遊離活性の測定結果を図16に示す。

【0064】

精製した組換え体hCERTを用いて、セラミドの遊離促進活性を測定した。微量のセラミドを含んだリン脂質多重膜小胞を遠心すると、セラミドはほぼ完全にリン脂質小胞とともに沈殿した。しかし、hCERTが共存する場合には、リン脂質多重膜小胞は完全に沈殿しながらも、セラミドは膜から遊離してhCERTとともに上清み画分に分配するようになった。すなわち、図14(A)及び(B)からわかる通り、hCERTの量及び保温時間の長さに依存して、リン脂質膜からのセラミドの遊離が検出された。一方、hCERTを加えない場合のセラミドの遊離はほぼゼロであった。これらの結果から、hCERTは、膜からのセラミド遊離を促進する活性を持つことが明らかになった。

【0065】

今までに、CERT以外でSTARTドメインを持つタンパク質が認識する脂質としては、ホスファチジルコリンやコレステロールが知られている。しかし、図15に示されるように、CERTタンパク質は、ジアシルグリセロール、コレステロール、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、スフィンゴシンに対して有意の遊離反応を示さなかった。また、セラミドと構造的に類似しているジアシルグリセロールの遊離促進は、セラミドに対する活性の5%程度であった。この結果から、CERTは、特異的にセラミドを膜から遊離させる活性を持つことが明らかになった。

【0066】

図16に示されるように、hCERTの各種欠失変異体を組換え体として作成・精製し、各ドメインのもつセラミド遊離促進活性について検討した。また、hCERT_LもhCERTと同様の活性を示した。PHドメインの欠失はセラミドの遊離促進活性に影響を与せず、MRドメインの欠失は若干活性を低下させた。一方、このセラミド遊離反応は、hCERTタンパク質からSTARTドメインを欠失すると起こらなくなり、一方、STARTドメインのみのSThCERTタンパク質でも活性を示した。なお、hCERT_Lは、hCERT同様のセラミド遊離促進活性を示した。こ

の結果から、hCERTによる膜からのセラミドの遊離はSTARTドメインを介して起こっていることが明らかになった。以上の結果から、CERTおよびCERT_Lは、それらのSTARTドメインを介して特異的にセラミドを脂質膜から遊離させる活性を持つことが明らかとなった。

【0067】

以上の結果から、CERTおよびCERT_Lは、それらのSTARTドメインを介して特異的にセラミドを脂質膜から遊離させる活性を持つことが明らかとなった。

【実施例2】

【0068】

<セラミドの膜間移動促進活性の測定方法>

ついで、以下に詳細に記載するように、セラミドの脂質膜の間の移動をhCERTタンパク質及び組換えタンパク質が促進するか否かを検討し、このアッセイにも精製したhCERTタンパク質及び組換えタンパク質を使用した。本法は、すでに報告されているホスファチジルイノシトール輸送タンパク質によるホスファチジルイノシトールの膜間移動促進活性の測定法 Kasperら (Biochim. Biophys. Acta 664, 22-32., 1981) の原理に基づき、新たにセラミドの膜間移動促進活性測定法となるように構築したものである。膜間移動促進活性を測定するために、放射性セラミドを含有した供与膜と、セラミドを含まない受容膜とを調製する。脂質膜の分離のために、供与膜にはラクトシルセラミドが含まれている。供与膜と受容膜を対象とするタンパク質試料とともに保温したのち、ヒマ豆レクチンを加える。低速遠心で沈降しなかった受容膜の放射活性を測定することにより膜間移動したセラミドを定量することができる。以下に標準的な方法の詳細を記載するが、記載した条件を変更しても、原理的に選択的な認識マーカーをセラミド供与膜または受容膜のいずれかに導入し、そのマーカーを利用してセラミド供与膜と受容膜を分離する手段を有する膜間移動促進活性検出方法は、全て本発明に属する。

【0069】

供与膜は、卵黄由来ホスファチジルコリン／ホスファチジルエタノールアミン／ラクトシルセラミド／セラミド=64／16／8／1からなる混合脂質の中に、1サンプル当たり12.5nCiの¹⁴C-セラミドと125nCiの[2-パルミトイル-9, 10-³H(N)] L- α -ジパルミトイルホスファチジルコリン(以下³H-DPPCと述べることもある)を加え、総脂質濃度が1.77 mg/mLになるように調製した。セラミドは¹⁴C-セラミドに非放射性セラミドを加えて目的の物質量にした。この脂質膜が活性測定1サンプル当たり20 μ L必要である。活性測定に必要な量の脂質をポリプロピレンマイクロチューブに分取したのち、窒素を吹き付けて乾固させた。乾固した脂質膜に濃度が1.77 mg/mLになるように、緩衝液1 [50 mM NaClおよび1 mM EDTAを添加した20 mMヘペス-NaOH緩衝液(pH 7.4)]を加えた後、投げ込み式超音波発生器(例えば、クボタ社製UP50H)を用いて超音波処理した。超音波処理は25 °Cの水浴上で10分間行った。このように調製した供与膜を4 °C、12,000 \times g、30分間の条件で遠心しても(遠心機、トミー社製MRX-150; 遠心チューブ、エッペンドルフ社製1.5-mLマイクロテストチューブ)、脂質膜の90%以上は沈降せずに上清に回収される。

【0070】

上清に残っている脂質膜と遠心前の脂質膜を液体シンチレーションカウンターで測定し、実験毎に両者の間で³Hの放射活性がほとんど変わらないことを確認した(通常90%以上が上清に回収された)。また、³Hの放射活性で求めた沈降／非沈降の比は、リン酸定量によって算出した値とほぼ同一の値を示し、供与膜に添加した³H-DPPCの分配から供与膜全体の分配を推測することが可能であることを確認した。

【0071】

受容膜は、卵黄由来ホスファチジルコリン／ホスファチジルエタノールアミン=4／1からなる混合脂質であり、総脂質濃度が5.33 mg/mLになるように調製した。この脂質膜が活性測定1サンプル当たり60 μ L必要である。活性測定に必要な量の脂質を1.5-mLマイクロテストチューブ(エッペンドルフ社製)に分取したのち、窒素を吹き付けて乾固させた。乾固した脂質膜に濃度が5.33 mg/mLになるように、緩衝液1を加えた後、投げ込み式超

音波発生器（例えば、クボタ社製UP50H）を用いて超音波処理した。超音波処理、及びそのあとの遠心条件等は、供与膜の調製と同様に行った。

【0072】

セラミドの膜間移動を促進する活性の検出は以下のように行った。1.5-mlマイクロテストチューブ（エッペンドルフ社製）中において、対象とするタンパク質試料であるhCERTタンパク質、hCERT_Lタンパク質、hCERT_{△PH}タンパク質、hCERT_{△MR}タンパク質、又はhCERT_{△ST}タンパク質、あるいはPHhCERTタンパク質、MRhCERTタンパク質又はSThCERTタンパク質と（標準条件では、供与膜中セラミドの0.4%モル等量に当たる2ピコモル相当のタンパク質を使用）と60 μLの受容膜を、緩衝液1を用いて80 μLにメスアップした。ここに20 μLの供与膜を加えて反応を開始し、37℃で15分間保温した。反応は2.5 mg/mlのヒマ豆レクチンを30 μL加え、ピベッティングにより攪拌することによって終了させた。凝集体を充分に形成させるため、氷浴上でさらに15分間保冷したのち、4℃、12,000 × g、3分間の条件で遠心した。上清をピペットで採取し、沈降した供与膜は130 μLの0.1%SDSにて溶かした。液体シンチレーションカウンター（アロカ社製LSC-5100；³H放射能と¹⁴C放射能との選別測定プログラムを使用）で、上清と供与膜の¹⁴Cの放射活性を測定することにより、試料がもつセラミドの膜間移動促進活性を測定した。試料を全く含まない場合でも、セラミドはごくわずかに膜間移動するので、これを自由拡散によるバックグラウンドとして差し引いた。供与膜に添加した³H-DPPCに由来する放射活性の大部分（通常90%以上）が供与膜とともに沈降していることを確認することで、供与膜と受容膜が選択的に分離されていることを実験毎に確認した。精製した組換え体hCERTを用いて、セラミドの膜間移動を促進する活性を測定した結果を図17（A）、（B）及び（C）に示す。さらに、hCERTタンパク質、hCERT_Lタンパク質、hCERT_{△PH}タンパク質、hCERT_{△MR}タンパク質、およびhCERT_{△ST}タンパク質、並びにPHhCERTタンパク質、MRhCERTタンパク質およびSThCERTタンパク質によるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定結果を図18に示す。

<タンパク質の定量法>

ピアース(Pierce)社のBCAアッセイ試薬を用いて、タンパク質を定量した。標準には、BSAを用いた。

【0073】

図17（A）、（B）及び（C）に示されるように、hCERTの量、保温時間の長さ、及び保温温度に依存して、膜間のセラミドの移動が検出された。一方、hCERTを加えない場合のセラミドの膜間移動はほぼゼロであった。微量の放射性セラミドを含んだセラミド供与膜小胞とセラミドを含まない受容膜小胞とを混ぜて保温した場合、それだけではセラミドは受容膜小胞に1時間たっても全く移行しなかった。ところが、hCERTが共存すると、セラミド移行が起こった。添加したCERT量によっては10分間で50%近いセラミドが受容膜小胞に移行した。なお、ここで用いた実験条件では、供与膜小胞と受容膜小胞の融合はhCERTの有無にかかわらず起こらなかった。これらの結果から、hCERTは、膜間セラミド移動を促進する活性を持つことが明らかになった。

【0074】

図18に示すように、hCERTの各種欠失変異体を組換え体を用いて、各ドメインのもつ膜間のセラミド移動促進活性について検討した。PHドメインの欠失は膜間セラミド移動促進活性に影響を与えることなく、MRドメインの欠失は若干活性を低下させた。一方、STARTドメインを欠失すると活性は完全に消失した。さらに、STARTドメインのみでも高い活性が検出されたが、他のドメインのみでは全く活性が検出されなかった。なお、hCERT_Lタンパク質は、hCERTタンパク質同様の活性を示した。よって、膜からのセラミド遊離促進と同様に、hCERTによる膜間セラミド移動促進はSTARTドメインを介して起こっていることが明らかになった。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】CERTタンパク質のドメイン構造及びドメイン欠失構造を示す図である。

【図2】レトロウイルスベクターを用いてhCERTを導入したLY-A2細胞のMCDおよびライセニンに対する感受性を測定した結果を示す図である。

【図3】(A)は、LY-A2/hCERT細胞のMCDおよびライセニンに対する反応性を示す図であり、(B)は、CHO-K1細胞、LY-A2細胞、又はLY-A2/hCERT細胞のリン脂質含有量を示す図である。

【図4】(A)は、CHO-K1細胞、LY-A2細胞、又はLY-A2/hCERT細胞における^{[14]C}セリンによる脂質代謝標識実験の結果を示す図であり、(B)は、CHO-K1細胞、LY-A2細胞、又はLY-A2/hCERT細胞における^{[14]C}コリンを用いた脂質代謝標識実験の結果を示す図である。

【図5】CHO-K1細胞、LY-A2細胞、又はLY-A2/hCERT細胞におけるSM合成酵素活性を示す図である。

【図6】CHO-K1細胞、LY-A2細胞、又はLY-A2/hCERT細胞におけるC₅-DMB-Cerを用いた細胞標識と蛍光顕微鏡観察の結果を示す図である。

【図7】CHO-K1細胞、LY-A2細胞、又はLY-A2/hCERT細胞におけるC₅-DMB-Cerの細胞内移動に及ぼすエネルギー阻害剤の影響を求めるために行われたC₅-DMB-Cerを用いた細胞標識と蛍光顕微鏡観察の結果を示す図である。

【図8】CHO-K1細胞、LY-A2細胞、又はLY-A2/hCERT細胞におけるSM新合成に及ぼす(1R, 3R)HPA-12の影響を調べるために行われた放射性セリンを用いた脂質代謝標識実験の結果を示す図である。

【図9】(A)は、CHO-K1細胞、LY-A細胞、又はLY-A/hCERT細胞のMCD感受性を示す図であり、(B)は、CHO-K1細胞、LY-A2細胞、又はLY-A/hCERT細胞における^{[14]C}セリンおよび^{[14]C}コリンを用いた脂質代謝標識実験の結果を示す図であり、(C)は、CHO-K1細胞、LY-A2細胞、又はLY-A/hCERT細胞におけるC₅-DMB-Cerを用いた細胞標識と蛍光顕微鏡観察の結果を示す図である。

【図10】(A)は、(LY-A2+FL-hCERT)細胞、(LY-A2+FL-hCERT_L)細胞、(LY-A2+空ベクター)細胞、CHO-K1細胞、及びLY-A2細胞のMCD感受性を示す図であり、(B)は、(LY-A2+FL-hCERT)細胞、(LY-A2+FL-hCERT_L)細胞、(LY-A2+空ベクター)細胞の抗FLAG抗体を用いたウエスタンプロット解析の結果を示す図である。

【図11】CHO-K1細胞、及びLY-A細胞におけるCERTタンパク質をコードするmRNAのノザンプロット解析の結果を示す図である。

【図12】(A)は、CHO-K1細胞、LY-A2細胞、(LY-A2+cCERT(G67E)-FL)細胞及び(LY-A2+cCERT-FL)細胞のMCD感受性を示す図であり、(B)は、抗FLAG抗体を用いたウエスタンプロット解析の結果を示す図である。

【図13】(A)は、(CHO-K1+pEGFP)細胞、(CHO-K1+pcCERT-GFP)細胞、(CHO-K1+pcCERT(G67E)-GFP)細胞に発現したGFPまたはGFP融・ERTとゴルジ体局在マークーとの顕微鏡観察による局在解析の結果を示す図であり、(B)は、CHO-K1細胞、(CHO-K1+pEGFP)細胞、(CHO-K1+pcCERT-GFP)細胞、(CHO-K1+pcCERT(G67E)-GFP)細胞を用いた抗GFP抗体を用いたウエスタンプロット解析の結果を示す図である。

【図14】(A)は、セラミドの遊離を促進する活性のhCERTタンパク質量への依存度を示す図であり、(B)は、セラミドの遊離を促進する活性の時間依存性を示す図である。

【図15】セラミド、ジアシルグリセロール、コレステロール、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、スフィンゴシンの遊離を促進する活性の測定結果を示す図である。

【図16】hCERTタンパク質、hCERT_Lタンパク質、hCERT△PHタンパク質、hCERT△MRタンパク質、およびhCERT△STタンパク質、並びにPHhCERTタンパク質、MRhCERTタンパク質およびSThCERTタンパク質によるセラミドの遊離活性の測定結果を示す図である。

【図17】(A)は、セラミドの膜間移動を促進する活性のhCERTタンパク質量への



依存度を示す図であり、(B)は、セラミドの膜間移動を促進する活性の時間依存性を示す図であり、(C)は、セラミドの膜間移動を促進する活性の温度依存性を示す図である。

【図18】hCERTタンパク質、hCERT_Lタンパク質、hCERT△PHタンパク質、hCERT△MRタンパク質、およびhCERT△STタンパク質、並びにPHhCERTタンパク質、MRhCERTタンパク質およびSThCERTタンパク質によるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定結果を示す図である。

【配列表フリーテキスト】

【0076】

配列番号1～4は、それぞれ、hCERTタンパク質のアミノ酸配列、hCERT_Lタンパク質のアミノ酸配列、cCERTタンパク質のアミノ酸配列、cCERT_Lタンパク質のアミノ酸配列を示す。配列番号5～8は、それぞれ、hCERT mRNAのORFの配列、hCERT_L mRNAのORFの配列、cCERT mRNAの全長cDNA配列、及びcCERT_L ORFのDNA配列を示す。配列番号9～32は、プライマーの配列を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation
manager of National Institute of Infectious Diseases

<120> Medicine for promoting ceramide transportation, sequence for manufacturing the medicine, method for measuring the promoting activity for ceramide isolation, and method for measuring the promoting activity for ceramide migration between membranes

<130> P000

<160> 32

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 598

<212> PRT

<213> HeLa cell

<400> 1

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
1 5 10 15

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
20 25 30

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
35 40 45

Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
50 55 60

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
65 70 75 80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
100 105 110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
115 120 125

Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
130 135 140

Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
145 150 155 160

Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
165 170 175

Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
180 185 190

Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
195 200 205

Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys
210 215 220

Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
225 230 235 240

Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
245 250 255

Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
260 265 270

Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
275 280 285

Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe
290 295 300

Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
305 310 315 320

Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
325 330 335

Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
340 345 350

Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
355 360 365

Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln
370 375 380

Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu
385 390 395 400

Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp
405 410 415

Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val
420 425 430

Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr
435 440 445

Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile
450 455 460

Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val
465 470 475 480

Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp
485 490 495

Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala
500 505 510

Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile
 515 520 525

Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg
 530 535 540

Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly
 545 550 555 560

Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr
 565 570 575

Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala
 580 585 590

Gly Lys Pro Ile Leu Phe
 595

<210> 2
 <211> 624
 <212> PRT
 <213> HeLa cell

<400> 2

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
 1 5 10 15

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
 20 25 30

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
 35 40 45

Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
 50 55 60

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp

65

70

75

80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
 85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
 100 105 110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
 115 120 125

Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
 130 135 140

Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
 145 150 155 160

Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
 165 170 175

Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
 180 185 190

Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 195 200 205

Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys
 210 215 220

Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
 225 230 235 240

Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 245 250 255

Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
 260 265 270

Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
 275 280 285

Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Ser His Phe
 290 295 300

Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
 305 310 315 320

Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
 325 330 335

Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
 340 345 350

Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 355 360 365

Gln Lys Pro Tyr Ser Arg Ser Ser Ser Met Ser Ser Ile Asp Leu Val
 370 375 380

Ser Ala Ser Asp Asp Val His Arg Phe Ser Ser Gln Val Glu Glu Met
 385 390 395 400

Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln Asp Val Gly Gly Asp Ala
 405 410 415

Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu Met Lys Val Tyr Arg Arg
 420 425 430

Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp Pro Leu Lys Ala Thr His
 435 440 445

Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val Cys Asn Tyr Phe Trp Asn
 450 455 460

Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr Ile Glu Asn Phe His Val

465

470

475

480

Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile Tyr Gln Thr His Lys
 485 490 495

Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val Leu Tyr Leu Ser Val Ile
 500 505 510

Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp Pro Glu Thr Trp Ile Val
 515 520 525

Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala Pro Leu Asn Asn Arg Cys
 530 535 540

Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile Cys Gln Thr Leu Val Ser
 545 550 555 560

Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg Asp Asn Ile Leu Cys Lys
 565 570 575

Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly Gly Trp Ala Pro Ala Ser
 580 585 590

Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr Pro Lys Phe Leu Lys Arg
 595 600 605

Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala Gly Lys Pro Ile Leu Phe
 610 615 620

<210> 3

<211> 598

<212> PRT

<213> CH0-K1

<400> 3

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
 1 5 10 15

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
 20 25 30

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
 35 40 45

Asn Asn Thr Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
 50 55 60

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
 65 70 75 80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
 85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
 100 105 110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
 115 120 125

Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
 130 135 140

Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
 145 150 155 160

Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
 165 170 175

Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Val Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
 180 185 190

Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 195 200 205

Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Asn Thr Asn Gly Asn Lys
 210 215 220

Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
225 230 235 240

Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
245 250 255

Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Glu Ser
260 265 270

Trp Gln Lys Arg His Asp Lys Glu Met Glu Lys Arg Arg Arg Leu Glu
275 280 285

Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Ala Glu Leu Lys Lys Lys Pro Arg Phe
290 295 300

Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
305 310 315 320

Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
325 330 335

Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Pro
340 345 350

Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
355 360 365

Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln
370 375 380

Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu
385 390 395 400

Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp
405 410 415

Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val
 420 425 430

Cys Asn Tyr Phe Trp Ser Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr
 435 440 445

Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile
 450 455 460

Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val
 465 470 475 480

Leu Tyr Leu Ser Ala Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp
 485 490 495

Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala
 500 505 510

Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile
 515 520 525

Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg
 530 535 540

Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly
 545 550 555 560

Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr
 565 570 575

Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala
 580 585 590

Gly Lys Pro Ile Leu Phe
 595

<210> 4
 <211> 624

<212> PRT
<213> CHO-K1

<400> 4

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
1 5 10 15

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
20 25 30

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
35 40 45

Asn Asn Thr Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
50 55 60

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
65 70 75 80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
100 105 110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
115 120 125

Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
130 135 140

Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
145 150 155 160

Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
165 170 175

Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Val Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp

180

185

190

Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 195 200 205

Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Asn Thr Asn Gly Asn Lys
 210 215 220

Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
 225 230 235 240

Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 245 250 255

Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Glu Ser
 260 265 270

Trp Gln Lys Arg His Asp Lys Glu Met Glu Lys Arg Arg Arg Leu Glu
 275 280 285

Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Ala Glu Leu Lys Lys Lys Pro Arg Phe
 290 295 300

Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
 305 310 315 320

Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
 325 330 335

Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Pro
 340 345 350

Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 355 360 365

Gln Lys Pro Tyr Ser Arg Ser Ser Ser Met Ser Ser Ile Asp Leu Val
 370 375 380

Ser Ala Ser Asp Asp Val His Arg Phe Ser Ser Gln Val Glu Glu Met
 385 390 395 400

Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln Asp Val Gly Gly Asp Ala
 405 410 415

Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu Met Lys Val Tyr Arg Arg
 420 425 430

Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp Pro Leu Lys Ala Thr His
 435 440 445

Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val Cys Asn Tyr Phe Trp Ser
 450 455 460

Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr Ile Glu Asn Phe His Val
 465 470 475 480

Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile Ile Tyr Gln Thr His Lys
 485 490 495

Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val Leu Tyr Leu Ser Ala Ile
 500 505 510

Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp Pro Glu Thr Trp Ile Val
 515 520 525

Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala Pro Leu Asn Asn Arg Cys
 530 535 540

Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile Cys Gln Thr Leu Val Ser
 545 550 555 560

Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg Asp Asn Ile Leu Cys Lys
 565 570 575

Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly Gly Trp Ala Pro Ala Ser

580

585

590

Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr Pro Lys Phe Leu Lys Arg
 595 600 605

Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala Gly Lys Pro Ile Leu Phe
 610 615 620

<210> 5

<211> 1794

<212> DNA

<213> HeLa cell

<400> 5

atgtcggata atcagagctg	gaactcgctg	ggctcgagg	aggatccaga	gacggagtct	60
gggccgcctg tggagcgctg	cgggtcctc	agtaagtgga	caaactacat	tcatgggtgg	120
caggatcggtt gggtagtttt	aaaaaataat	gctctgagtt	actacaatc	tgaagatgaa	180
acagagttatg gctgcagagg	atccatctgt	cttagcaagg	ctgtcatcac	acctcacat	240
tttgatgaat gtcgatttga	tattagtgtt	aatgatagtg	tttggtatct	tcgtgctcag	300
gatccagatc atagacagca	atggatagat	gccattgaac	agcacaagac	tgaatctgga	360
tatggatctg aatccagctt	gcgtcgacat	ggctcaatgg	tgtccctgg	gtctggagca	420
agtggctact ctgcaacatc	cacctttca	ttcaagaaag	gccacagttt	acgtgagaag	480
ttggctgaaa tggaaacatt	tagagacatc	ttatgttagac	aagttgacac	gctacagaag	540
tactttgatg cctgtgctga	tgctgtctct	aaggatgaac	ttcaaaggga	taaagtggta	600
gaagatgatg aagatgactt	tcctacaacg	cgttctgatg	gtgacttctt	gcatagtacc	660
aacggcaata aagaaaagtt	atttccacat	gtgacaccaa	aaggaattaa	tggtagac	720
tttaaagggg aagcgataac	ttttaaagca	actactgctg	gaatccttgc	aacactttct	780
cattgtattg aactaatggt	taaacgtgag	gacagctggc	agaagagact	ggataaggaa	840
actgagaaga aaagaagaac	agaggaagca	tataaaaatg	caatgacaga	acttaagaaa	900
aaatcccact ttggaggacc	agattatgaa	gaaggcccta	acagtctgat	taatgaagaa	960
gagttcttg atgctgttga	agctgcttt	gacagacaag	ataaaataga	agaacagtca	1020

cagagtgaaa aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgcctttct 1080
 tctgtgggga cacatagatt tgtccaaaag gttgaagaga tggtgcaagaa ccacatgact 1140
 tactcattac aggatgttagg cgaggatgcc aattggcagt tggttgtaga agaaggagaa 1200
 atgaaggtat acagaagaga agtagaagaa aatgggattt ttctggatcc tttaaaagct 1260
 acccatgcag ttaaaggcgt cacaggacat gaagtctgca attattctg gaatgttgac 1320
 gttcgcaatg actggaaac aactatagaa aactttcatg tggtgaaac attagctgat 1380
 aatgcaatca tcatttatca aacacacaag aggtgtggc ctgcttctca gcgagacgta 1440
 ttatatctt ctgtcattcg aaagatacca gccttgactg aaaatgaccc tgaaacttgg 1500
 atagtttcta attttctgt ggatcatgac agtgccttc taaacaaccg atgtgtccgt 1560
 gccaaaataa atgttgctat gatttgtcaa accttggtaa gcccaccaga gggaaaccag 1620
 gaaatttagca gggacaacat tctatgcaag attacatatg tagctaattgt gaaccctgga 1680
 ggatggcac cagcctcagt gtttaaggca gtggcaaagc gagagtatcc taaatttcta 1740
 aaacgtttta cttcttacgt ccaagaaaaa actgcaggaa agcctatttt gttc 1794

<210> 6
 <211> 1872
 <212> DNA
 <213> HeLa cell

<400> 6
 atgtcgata atcagagctg gaactcgctg ggctcgagg aggtccaga gacggagtct 60
 gggccgcctg tggagcgctg cggggcctc agtaagtggaa caaactacat tcatgggtgg 120
 caggatcggtt gggtagttt gaaaaataat gctctgagtt actacaatc tgaagatgaa 180
 acagagtatg gctgcagagg atccatctgt cttagcaagg ctgtcatcac acctcacat 240
 tttgatgaat gtcgatttga tattagtgtt aatgatagtg tttggatct tcgtgctcag 300
 gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga 360
 tatggatctg aatccagctt gcgtcgacat ggctcaatgg tgcctcggt gtctggagca 420
 agtggctact ctgcaacatc cacctttca ttcaagaaag gccacagttt acgtgagaag 480

ttggctgaaa tggaaacatt tagagacatc ttatgttagac aagttgacac gctacagaag	540
tactttgatg cctgtgctga tgctgtctct aaggatgaac ttcaaaggga taaagtggta	600
gaagatgatg aagatgactt tcctacaacg cgttctgatg gtgacttctt gcatagttacc	660
aacggcaata aagaaaagtt atttccacat gtgacaccaa aaggaattaa tggtatagac	720
tttaaagggg aagcgataac ttttaaagca actactgctg gaatccttgc aacactttct	780
cattgtattg aactaatggt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa	840
actgagaaga aaagaagaac agaggaagca tataaaaatg caatgacaga acttaagaaa	900
aaatcccact ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa	960
gagttcttg atgctgtga agctgctttt gacagacaag ataaaataga agaacagtca	1020
cagagtgaaa aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgcctttct	1080
tctgtgggga cacatagatt tgtccaaaag ccctatagtc gctttcctc catgtcttcc	1140
attgatctag tcagtgcctc tcatgtatgtt cacagattca gctcccaggt tgaagagatg	1200
gtgcagaacc acatgactta ctcattacag gatgtaggcg gagatgccaa ttggcagttg	1260
gttgtagaag aaggagaaat gaaggtatac agaagagaag tagaagaaaa tgggattttt	1320
ctggatcctt taaaagctac ccatgcagtt aaaggcgtca caggacatga agtctgcaat	1380
tatttctgga atgttgacgt tcgcaatgac tggaaacaa ctatagaaaa ctcatgtg	1440
gtggaaacat tagctgataa tgcaatcatc atttatcaaa cacacaagag ggtgtggcct	1500
gcttctcagc gagacgtatt atatcttct gtcattcgaa agataccagc ctgtactgaa	1560
aatgaccctg aaacttggat agttttaat tttctgtgg atcatgacag tgctcctcta	1620
aacaaccgat gtgtccgtgc caaaataat gttgctatga tttgtcaaac ctggtaagc	1680
ccaccagagg gaaaccagga aattagcagg gacaacattc tatgcaagat tacatatgt	1740
gctaattgtga accctggagg atggcacca gcctcagtgt taagggcagt ggcaaagcga	1800
gagttatccta aatttctaaa acgtttact tcttacgtcc aagaaaaaac tgcaggaaag	1860
cctattttgt tc	1872

<211> 2473
<212> DNA
<213> CHO-K1

<400> 7	
acgcggggag tgggccccgc aggaagatgg cggcggtagc ggagggtgtga gcggaccctgg	60
gtctctgccc ctggcttggc ttttcctgtc ttccctccct cttccctccc cgactgaggt	120
tggcacccag ggggcccgagt tcaggtggcg ggcgcgggca cagcgcaggg gtcacggcca	180
cggccacggc ggctgacggc tgaaaggca ggcttccttc gccgctcgta cttccctccca	240
ggtccgctcg gtgtcaggcg cggcgacggc ggcgcagcgg ggcgcgttcc tccctttcc	300
tgttccctca cgccccggag cgggcactct tggctgtgcc atccccgac cttcacccca	360
aggactggg cgcctgcact ggcgcagctc tcggagcggg ggccggcttc ctgctgcct	420
gtcgccctc catgtcggat aaccagagct ggaactcgta gggctcgag gaggatccgg	480
agacggagtc cggccgcct gtggagcgct gcggggctt cagcaagtgg acaaactata	540
ttcatgggt gcaggatcgt tggtagttt tgaaaaataa tacttgagt tactacaat	600
ctgaagatga gacagagtac gttgcaggg gatccatctg tcttagcaag gctgtatca	660
cacctcatga tttttagaa tgtcggttg atatcgtgt taatgatagt gtttgtatc	720
ttcgtgctca ggaccagat cacagacagc agtggataga tgccattgaa cagcacaaga	780
ctgaatcagg atatggatct gagtccagct tacgttagaca tggctcaatg gtgtcactgg	840
tgtctggagc aagtgggtac tctgctacat ccacatctt attcaagaaa ggacacagtt	900
tacgtgagaa attggctgaa atggaaactt ttagagacat cttatgtaga caagttgaca	960
ctctccaaaa gtactttgat gtctgtctg atgctgtctc caaggatgaa cttcaaaggg	1020
ataaaagtgg agaagatgat gaagatgact tccctacaac tcgttctgat ggagacttt	1080
tgcacaatac caatggtaat aaggaaaaat tattccaca tgtaaccccc aaaggaatta	1140
atggtataga cttaaaggg gaagcaataa cttaaagc aactactgct ggaatccttg	1200
ctacactttc tcattgtatt gaattaatgg taaaacggga agagagctgg caaaaaagac	1260
atgataagga aatggagaag agaagacgt tagaggaagc atacaagaat gcaatggcag	1320
agcttaagaa gaaacccgt ttggaggc ctgattatga agaaggtccg aacagtctga	1380

ttaatgagga ggagttcttt gatgctgttg aagctgctct tgacagacaa gataaaatag	1440
aggaacagtc acagagcgag aaggtcaggt tacactggcc tacacccttg ccatctggag	1500
atgcctttc ttctgttggg acccatagat ttgtacaaaa ggttgaagag atggcacaga	1560
accacatgac ttactcatta caggatgtag gtggtgatgc gaattggcaa ctatgttag	1620
aagaaggaga aatgaaggta tacagaagag aagtgcaga aaatgaaatt gttctggatc	1680
ctttgaaagc taccatgca gttaaaggta ttacaggaca cgaagtcgc aattacttt	1740
ggagtgttga tggtcgcaat gactggaaa ctactataga aaacttccat gtatggaaa	1800
cattagctga taatgcaatc atcatttac aaacgcacaa gagagtgtgg cctgcttctc	1860
agagagatgt actgtatctt tctgcttattc gaaagatccc agccttgact gagaacgacc	1920
ctgagacttg gatagtttgt aattttctg tggatcatga cagcgctcct ctgaacaatc	1980
gatgtgtccg tgccaaaatc aatgttgcta tgattgtca aaccttagta agccaccag	2040
aggaaacca ggaataagc agagacaaca ttctgtcaa gattacatat gtagctaatt	2100
tgaacccagg aggatggca ccagcctcgg tgttaagagc agtggcaaaa cgagaatatc	2160
ctaaatttct aaaacgtttt acttcttacg tccaagaaaa aactgcagga aaaccaattt	2220
tgttttagta tgtacagtga ctgaagcaag gctgtgtgac attccatgtt ggagaaagaa	2280
agaagaaaaa ttgagttctc taagctggaa cataggatct acagccttgtt ccatggccca	2340
agaagaatca ttgcaatagt aaagctgggt atctaacct agccatctcc tgatagatct	2400
ccttgctcaa tgtgtacta taaatacatg taaaatcaca tgcaaaaaaaaaaaaaaaaaa	2460
aaaaaaaaaaa aaa	2473

<210> 8
 <211> 1872
 <212> DNA
 <213> CHO-K1

<400> 8 atgtcgatata accagagctg gaactcgatcg ggctcgagg aggatccgga gacggatcc	60
ggccgcctg tggagcgctg cgggtcctc agcaagtggaa caaactatata tcatgggtgg	120

caggatcggtt ggtagttt gaaaaataat acttgagtt actacaaatc tgaagatgag	180
acagagtacg gttgcagggg atccatctgt ctttagcaagg ctgtgatcac acctcatgat	240
tttgcgttatgtatgtt aatgatagtg ttggatct tcgtgctcag	300
gaccaggatc acagacagca gtggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatcagga	360
tatggatctg agtccagtt acgttagacat ggctcaatgg tgtcaactgg gtctggagca	420
agtgggtact ctgctacatc cacatcttca ttcaagaaag gacacagttt acgtgagaaa	480
ttggctgaaa tggaaacttt tagagacatc ttatgttagac aagttgacac tctccaaaag	540
tactttgatg tctgtgctga tgctgtctcc aaggatgaac ttcaaaggga taaagtggta	600
gaagatgatg aagatgactt ccctacaact cggtctgatg gagactttt gcacaatacc	660
aatggtaata aggaaaaatt atttccacat gtaacccccca aaggaattaa tggtagac	720
tttaaagggg aagcaataac ttttaaagca actactgctg gaatccttgc tacactttct	780
cattgtattt aattaatggt aaaacgggaa gagagctggc aaaaaagaca tgataaggaa	840
atggagaaga gaagacgatt agaggaagca tacaagaatg caatggcaga gcttaagaag	900
aaaccccggtt ttggagggcc tgattatgaa gaaggtccga acagtctgat taatgaggag	960
gagttcttgc atgctgttga agctgctctt gacagacaag ataaaataga ggaacagtca	1020
cagagcgaga aggtcaggtt acactggcct acacctttgc catctggaga tgcctttct	1080
tctgttggga cccatagatt tgtacaaaag ccctatagtc gctcttcctc catgtcttcc	1140
attgatctatc tcaatgcctc tgacgtatgtt cacagattca gctcccaggt tgaagagatg	1200
gtacagaacc acatgactta ctcattacag gatgttagtg gtgtatgc gaa ttggcaacta	1260
gtttagaaag aaggagaaat gaaggatatac agaagagaag tcgaagaaaa tggatttt	1320
ctggatcctt tgaaagctac ccatgcagtt aaagggttta caggacacga agtctgcaat	1380
tactttggta gtgttgcgtt tcgcaatgac tggaaacta ctatagaaaa cttccatgt	1440
gtggaaacat tagctgataa tgcaatcatc atttatcaaa cgcacaagag agtgtggcct	1500
gcttctcaga gagatgtact gtatcttct gctattcgaa agatcccagc cttgactgag	1560
aacgaccctg agacttggat agtttgtat tttctgtgg atcatgacag cgctcctctg	1620

aacaatcgat gtgtccgtgc caaaatcaat gttgctatga tttgtcaaac cttagtaagc 1680
 ccaccagagg gaaaccagga aataaggcaga gacaacattc tgtgcaagat tacatatgt 1740
 gctaattgtga acccaggagg atgggcacca gcctcggtgt taagagcagt ggcaaaacga 1800
 gaatatccta aatttctaaa acgtttact tcttacgtcc aagaaaaaac tgaggaaaa 1860
 ccaattttgt tt 1872

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 9
 gccctcactc cttctctagg cg 22

<210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 10
 cttaagcttag cttgccaaac ctacagg 27

<210> 11
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 11
 cagaattcac catgtcgat aatcagagct gg 32

<210> 12
 <211> 56
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

cagaattcac catggactac aaggacgacg acaaaatgtc ggataatcag agctgg

56

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

ggctcgagct agaacaaaat aggcttcct gc

32

<210> 14

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

ggctcgagct atttgcgtc gtcctttag tcgaacaaa taggcttcc tgc

53

<210> 15

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

cagaggcact gactagatca atggaagaca tggaggaaga gcgactatag ggctttgga

60

caaatctatg tgtcc

75

<210> 16

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

ccattgatct agtcagtgcc tctgatgatg ttcacagatt cagctccag gttgaagaga 60
tggtgcaaaa cc 72

<210> 17

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 17

cagaattcac catgaaatct ggatatggat ctgaatc 37

<210> 18

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 18

ggctcgagct attggacaaa tctatgtgtcc 32

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 19

ctcttcaacc ttagtcttgt gctgttcaat ggc 33

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 20

cagcacaaga ctaagggtga agagatggtg cag

33

<210> 21

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

cacaaggcttc ggataatcag agctggaac

29

<210> 22

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

ggctcgagct aagatctagt cttgtgctgt tcaatggc

38

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 23

cacaaggcttc ggaatctgga tatggatctg aatcc

35

<210> 24

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>		
<223> PCR primer		
<400> 24		
ggctcgagct aagatcttg gacaaatcta tgtgtccc		38
<210> 25		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> PCR primer		
<400> 25		
cacaagcttc gaagggtgaa gagatggtgc ag		32
<210> 26		
<211> 38		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> PCR primer		
<400> 26		
ggctcgagct aagatctgaa caaaataggc ttccctgc		38
<210> 27		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> PCR primer		
<400> 27		
gagaaaagtgt agcaaggatt ccagcagtag ttgc		34
<210> 28		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> PCR primer		

<400> 28
gaagatgact tccctacaac tcgttctgat gg 32

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 29
tagaattcac tggcgagct ctgc 24

<210> 30
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 30
ggctcgagga atgtcacaca gccttg 27

<210> 31
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 31
aagatcccag ctttgactg 19

<210> 32
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

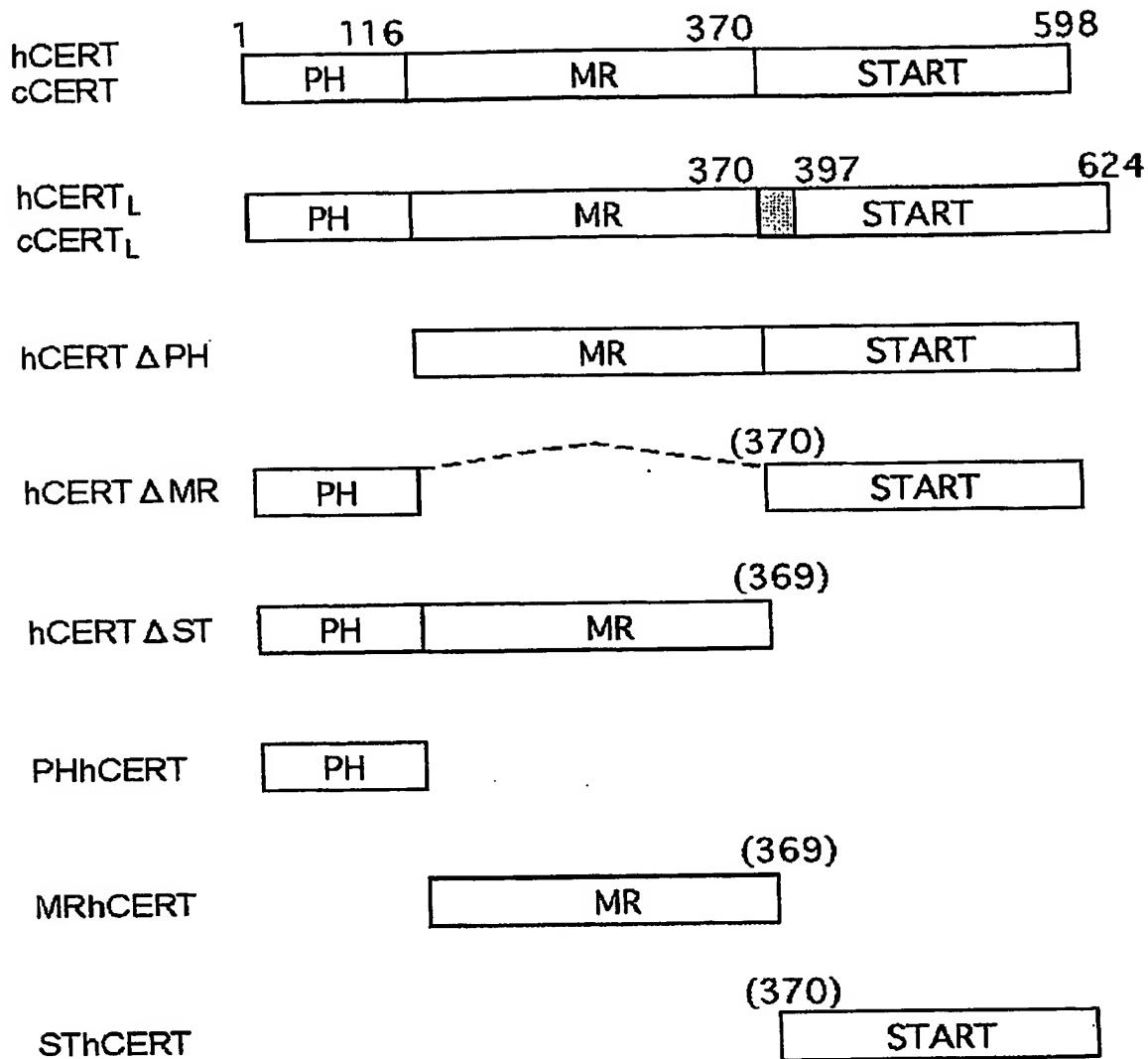
<400> 32

ggctcgagga acaaaatagg ctttcctgc

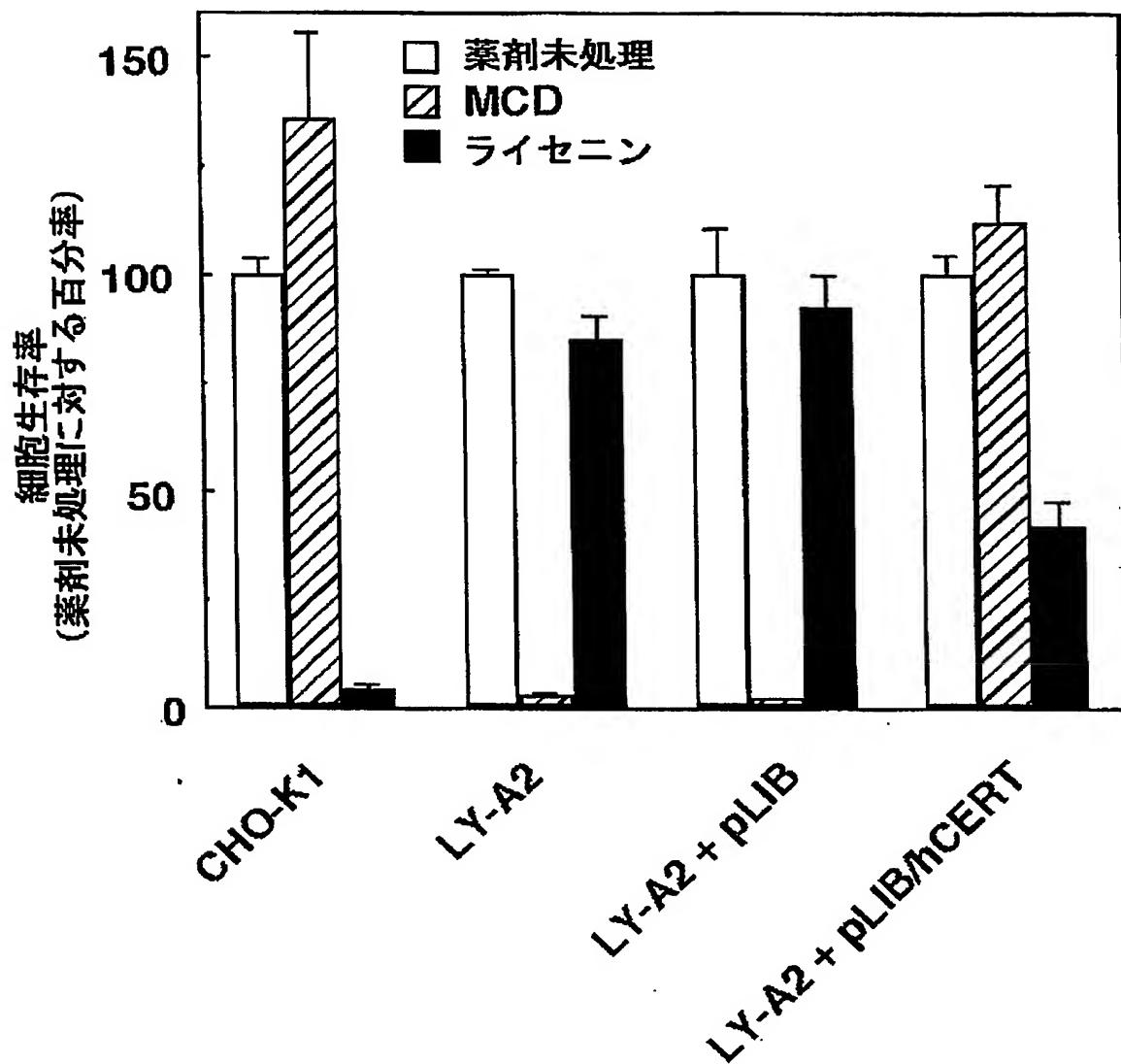
29

出証特2004-3037408

【書類名】 図面
【図1】

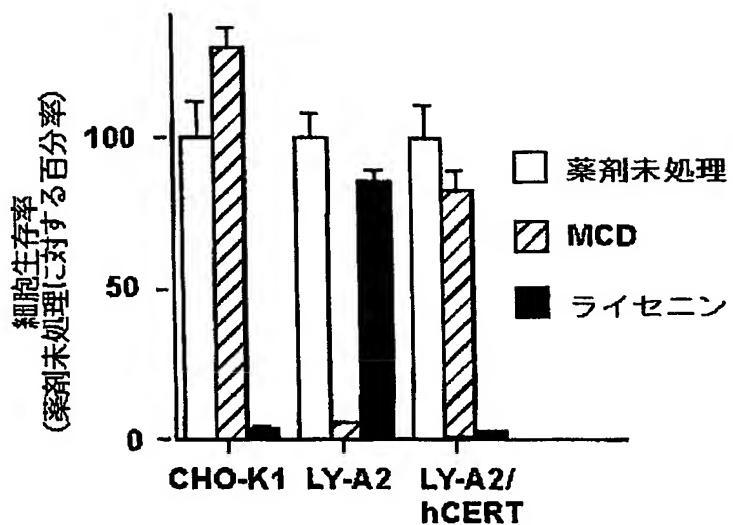


【図2】

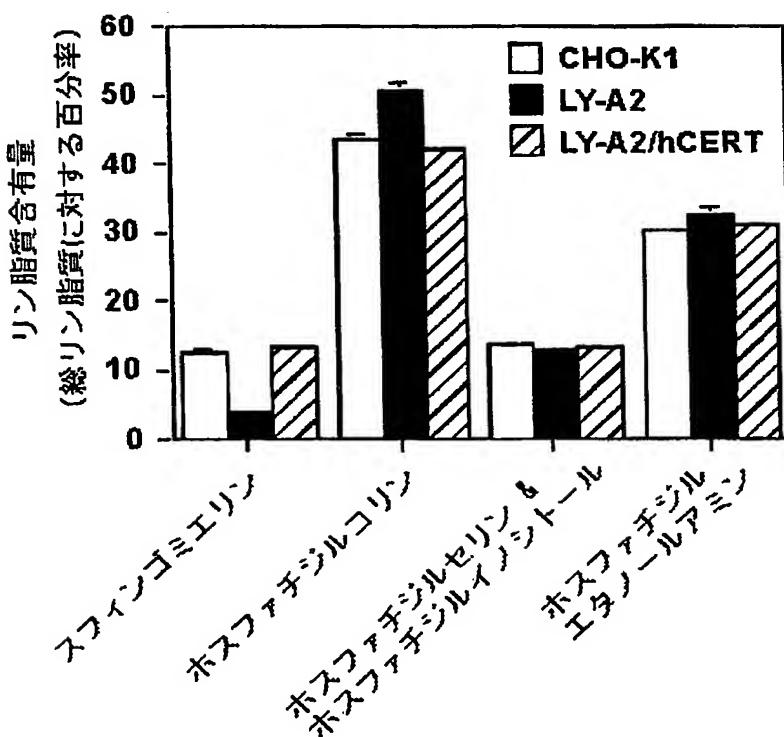


【図3】

(A)

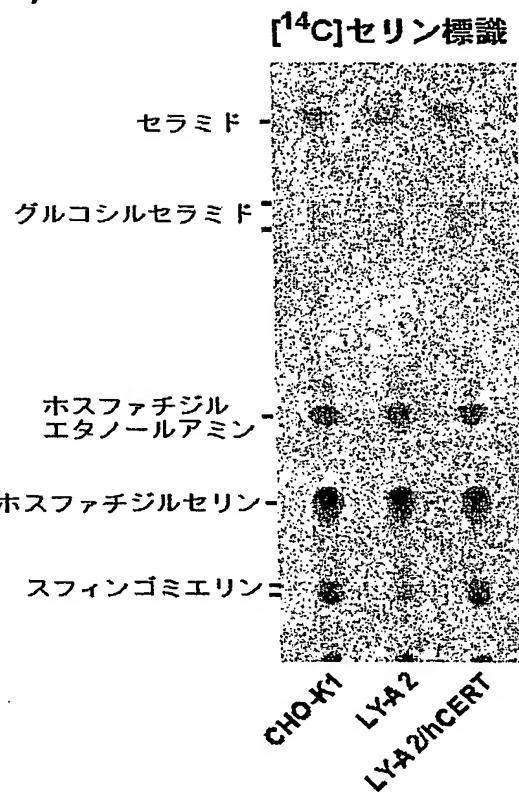


(B)

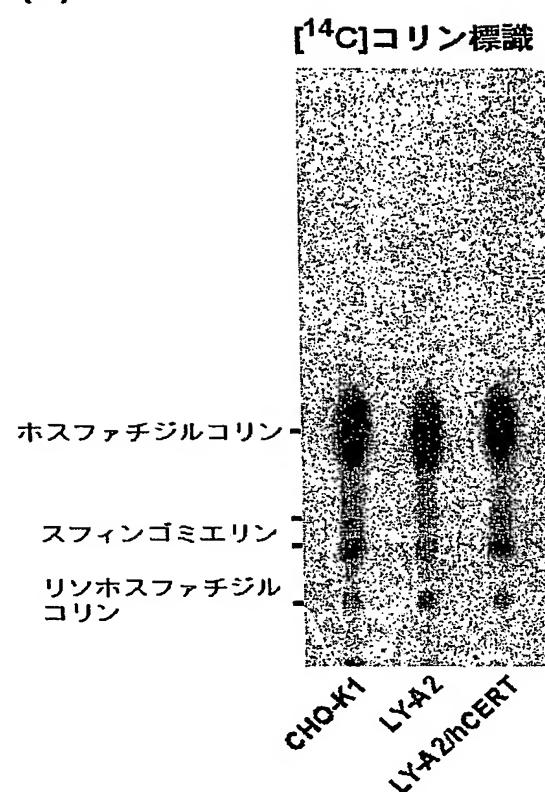


【図4】

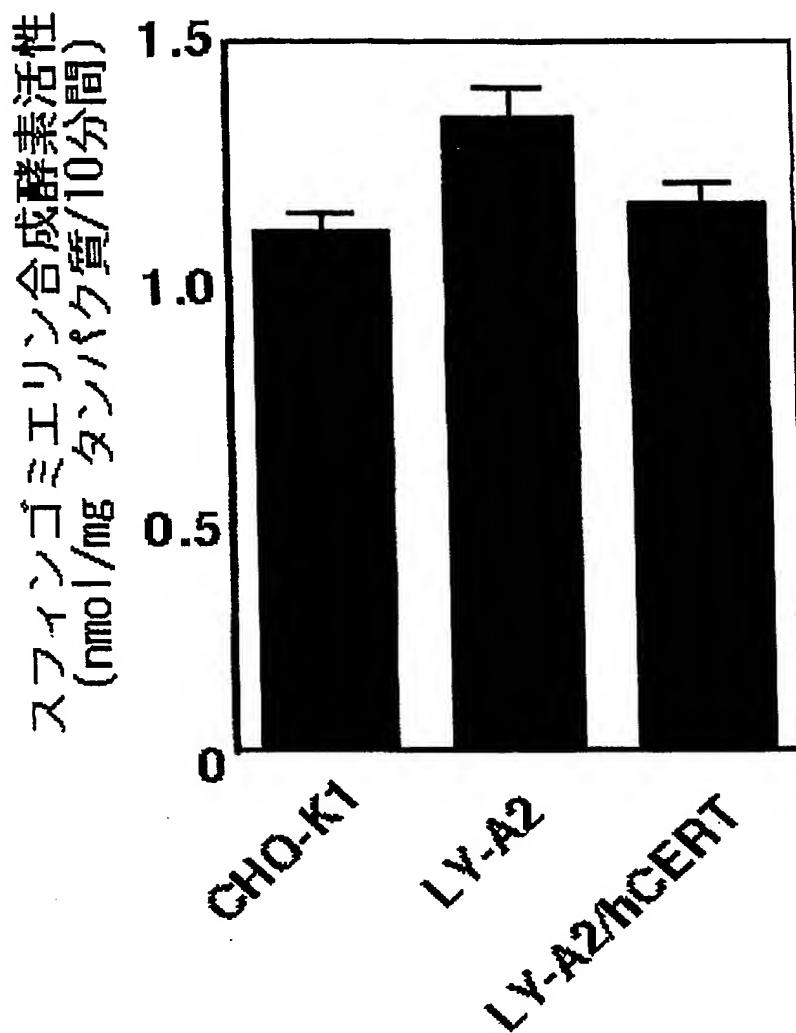
(A)



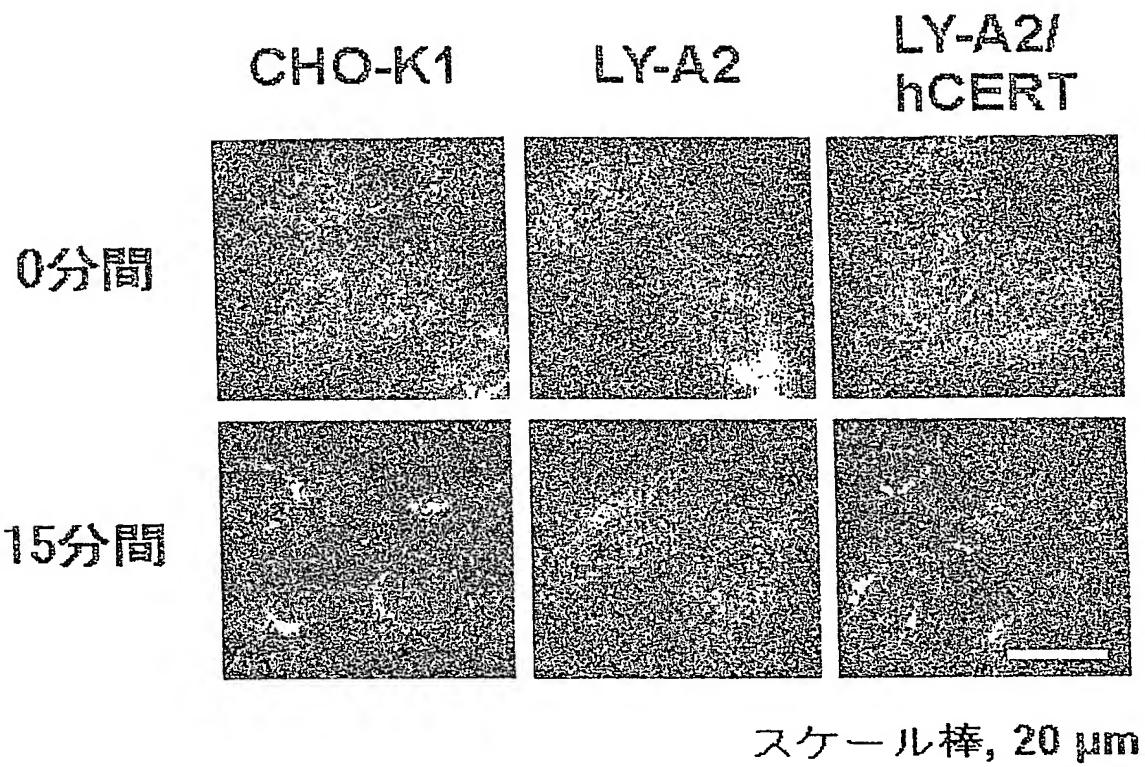
(B)



〔図5〕



【図6】



【図7】

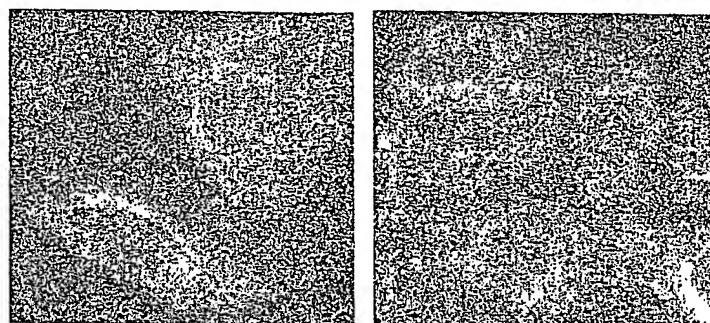
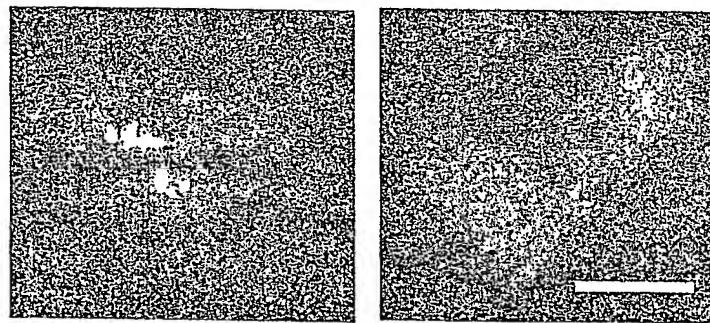
エネルギー阻害剤

- +

CHO-K1

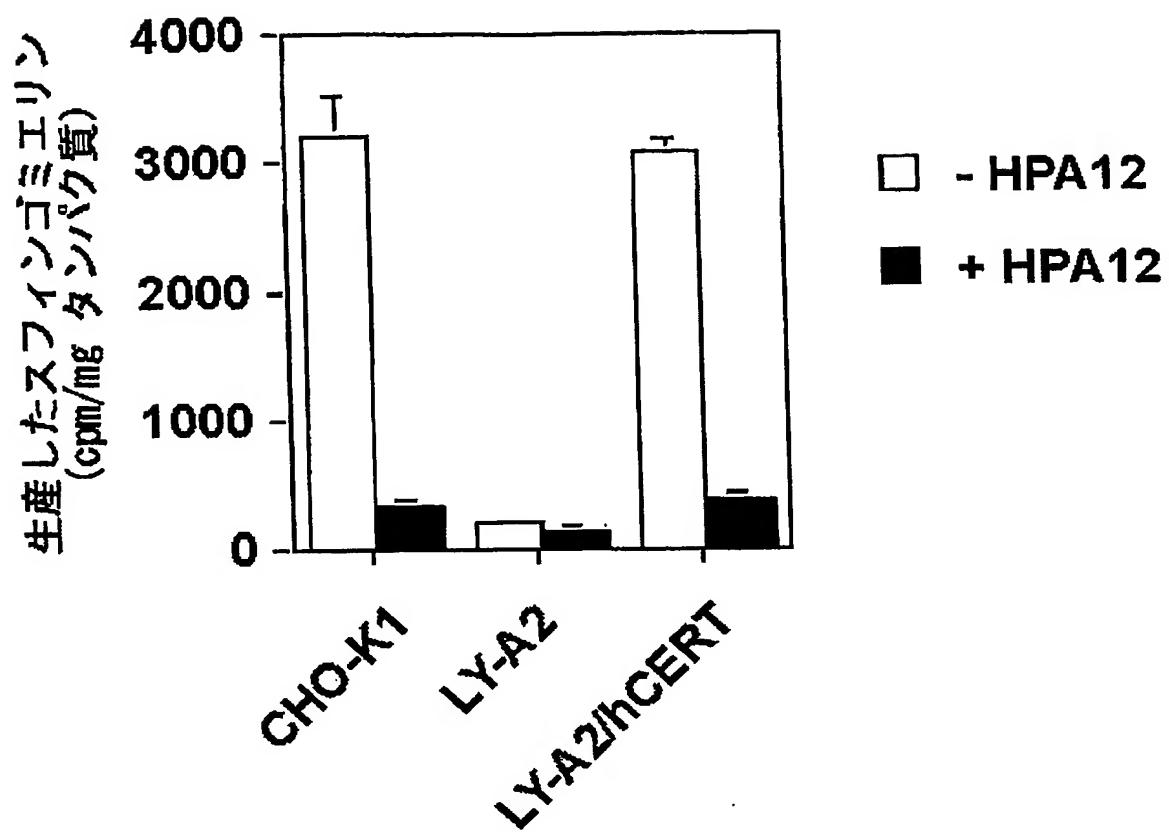


LY-A2

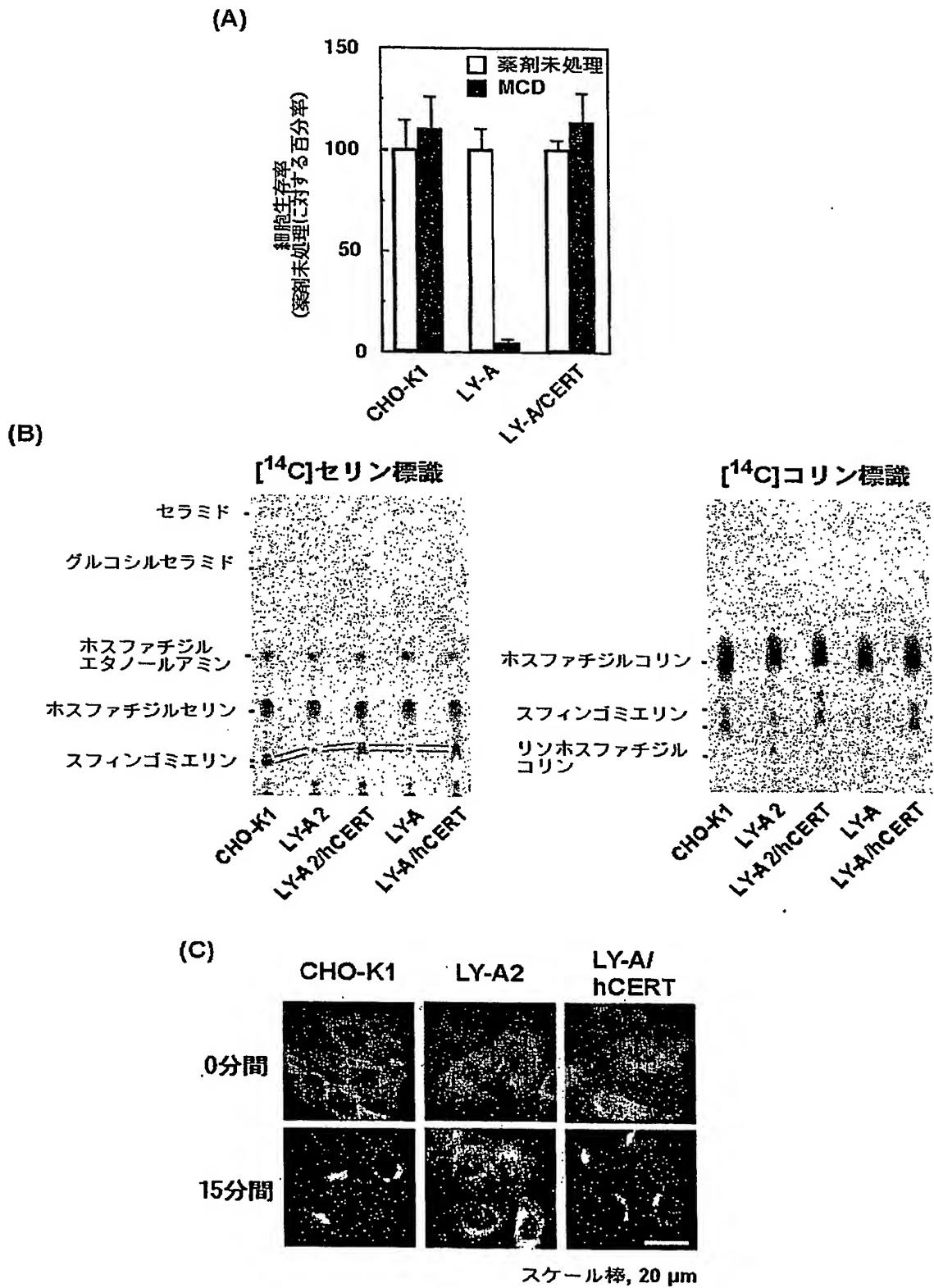
LY-A2/
hCERT

スケール棒, 20 μm

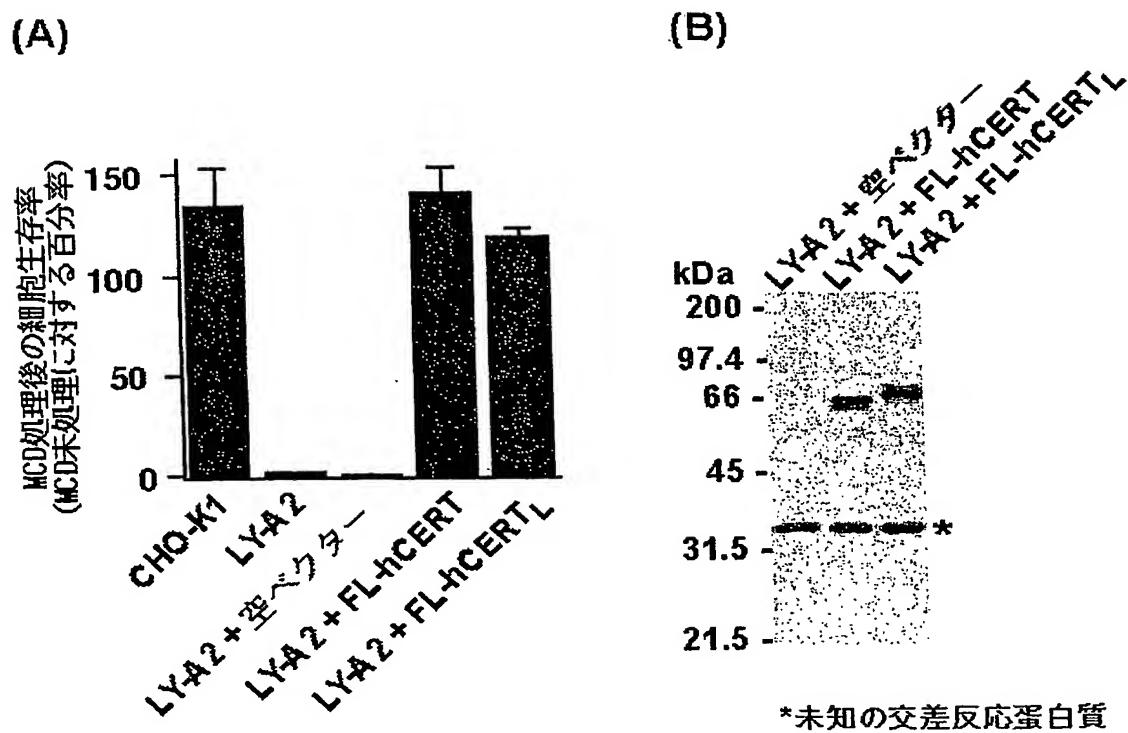
【図8】



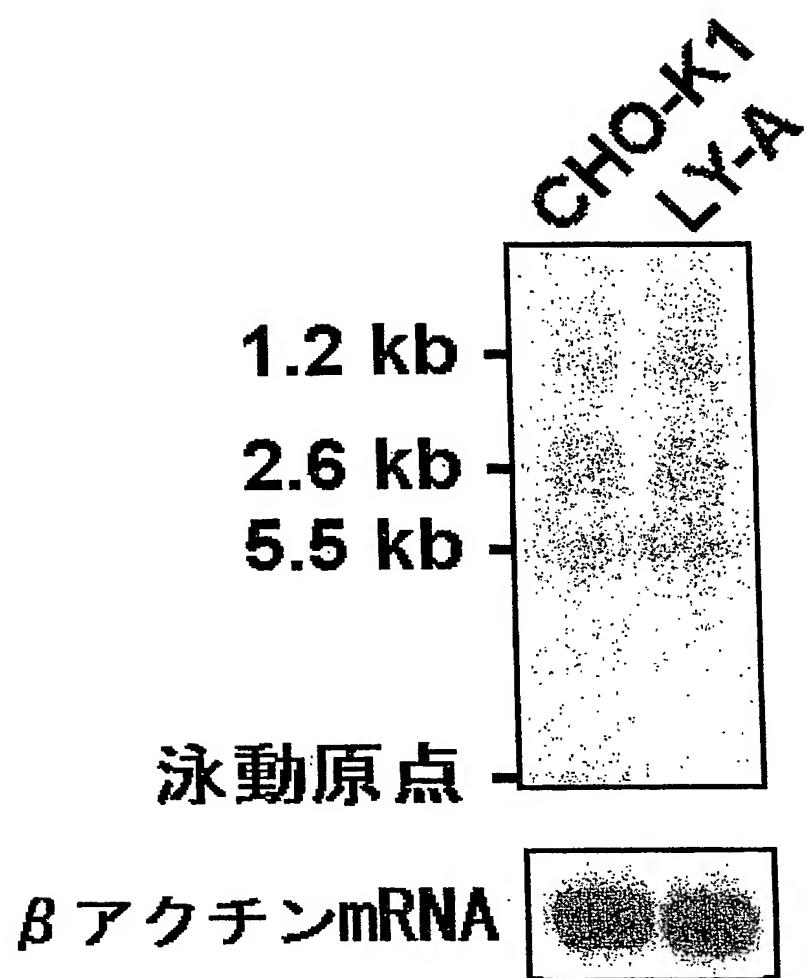
【図 9】



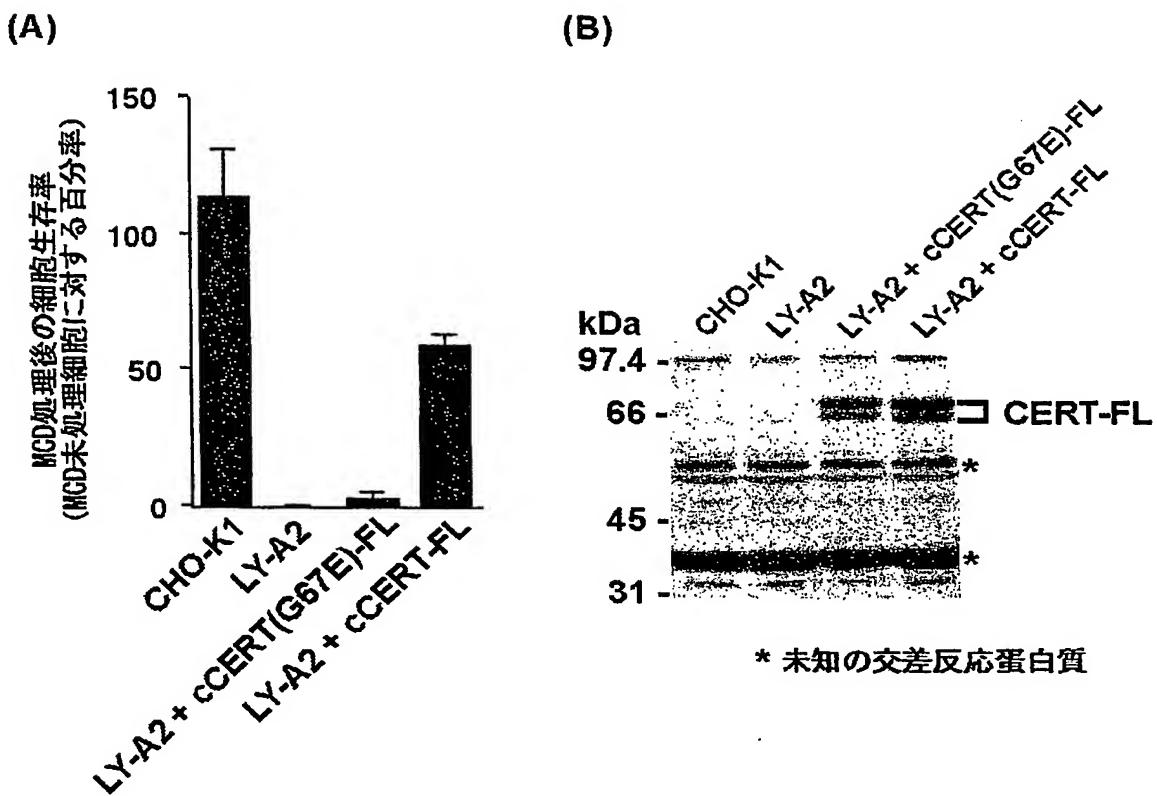
【図10】



【図11】

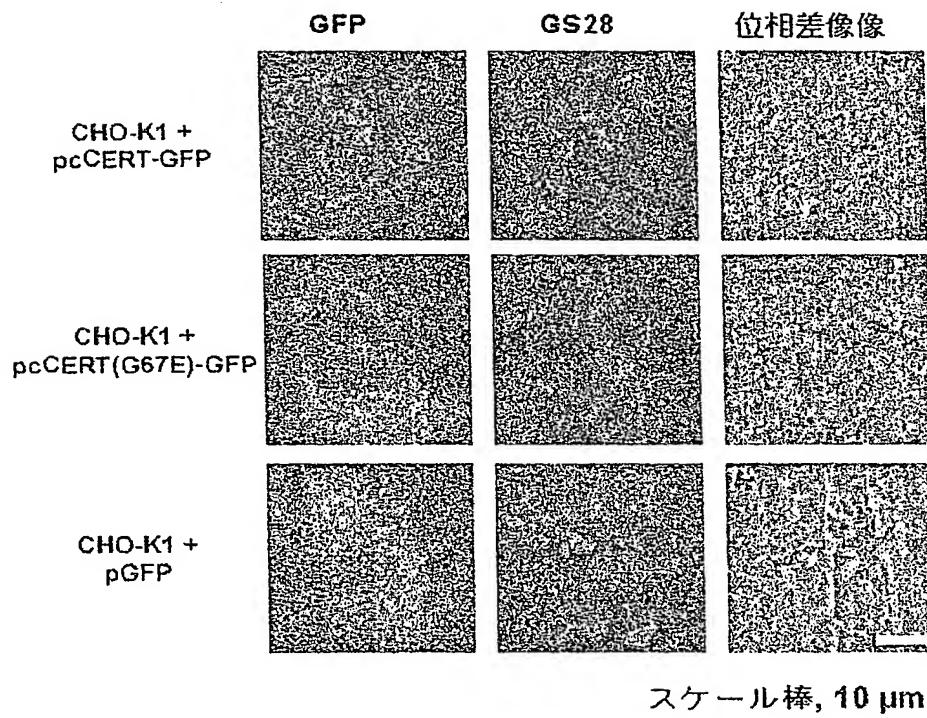


【図12】

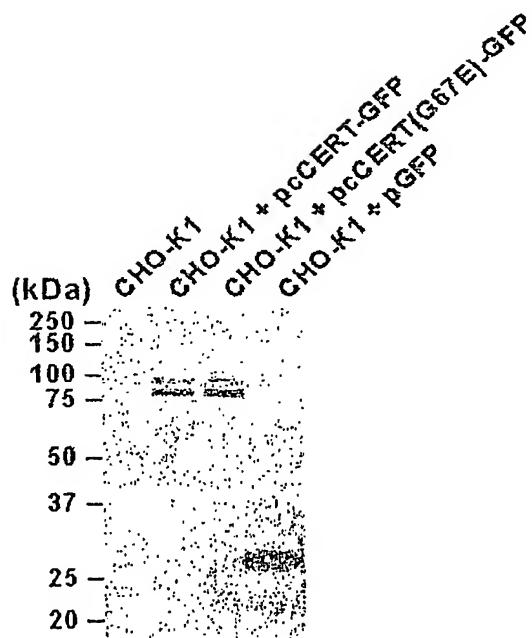


【図13】

(A)

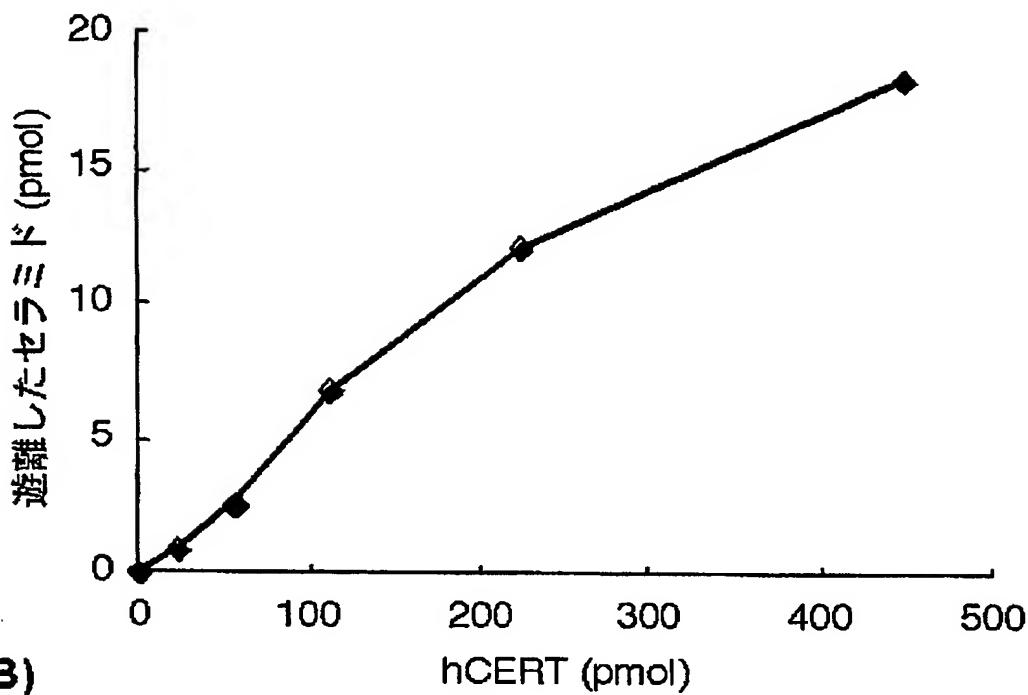


(B)

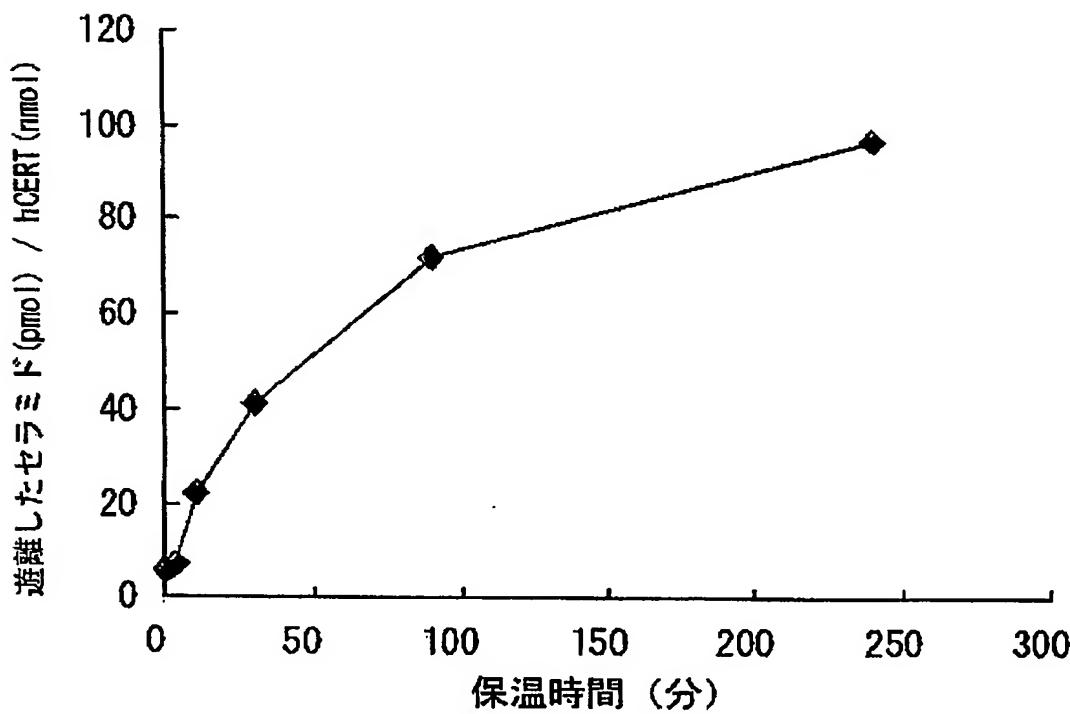


【図14】

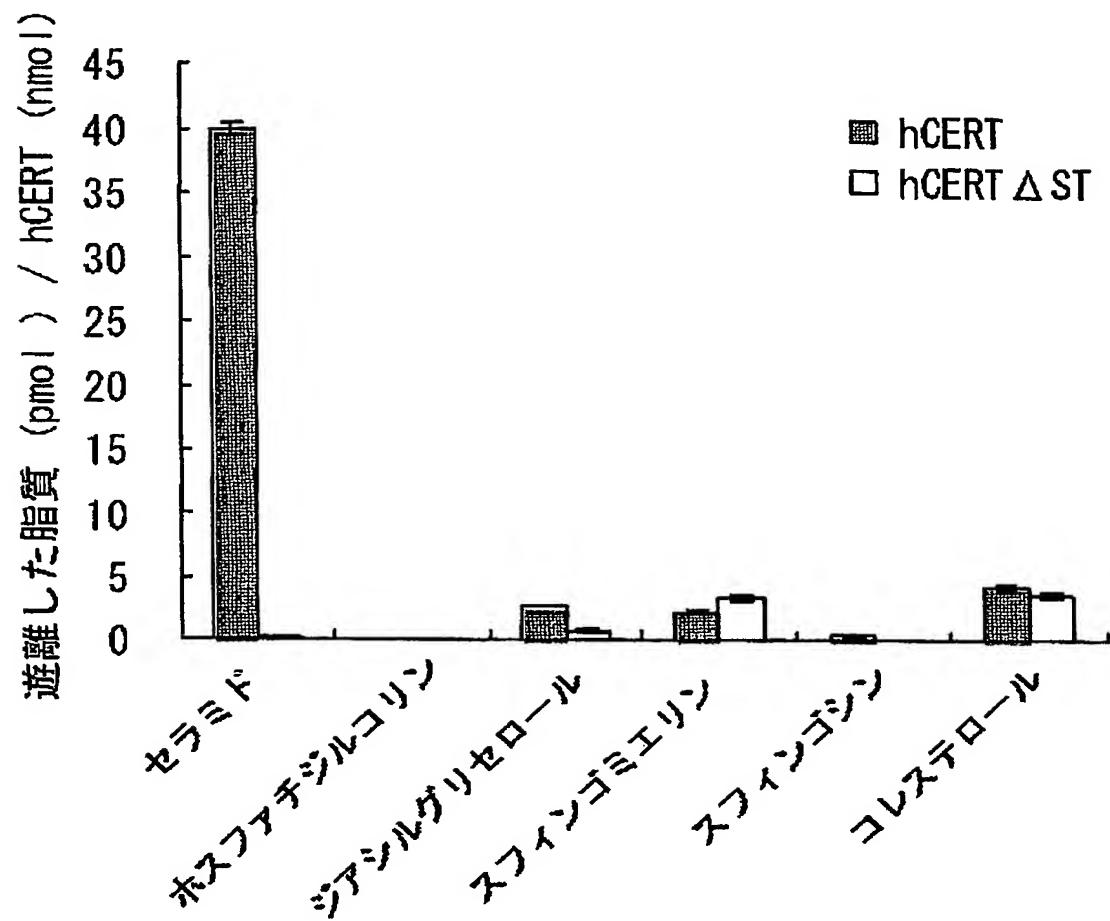
(A)



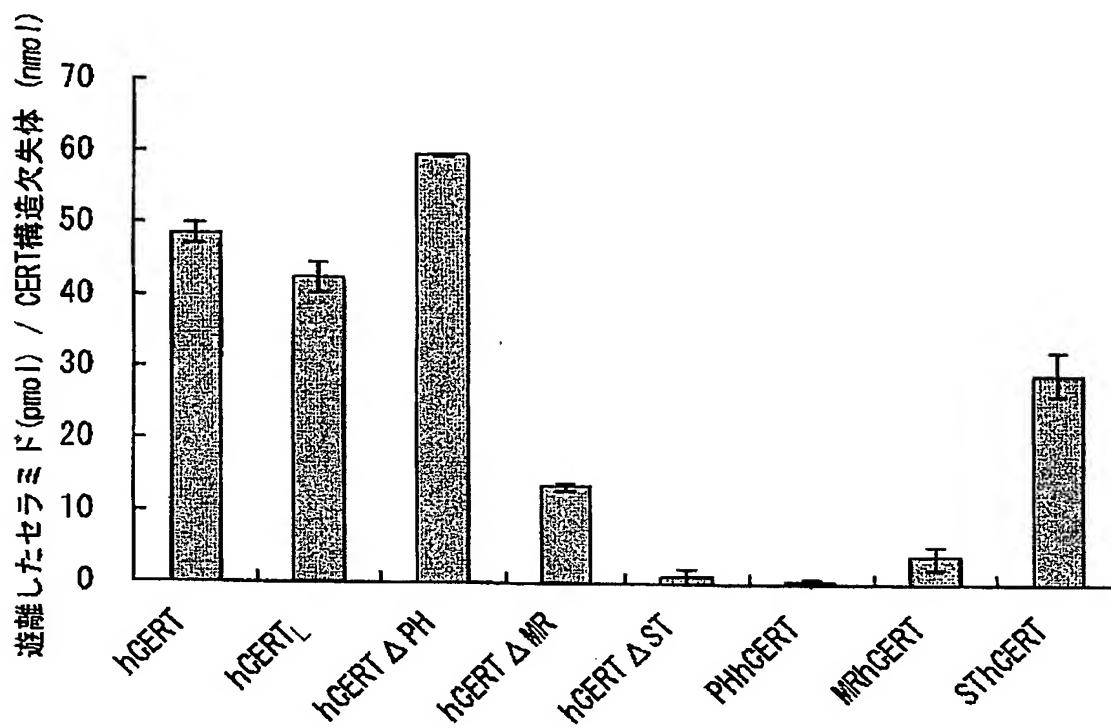
(B)



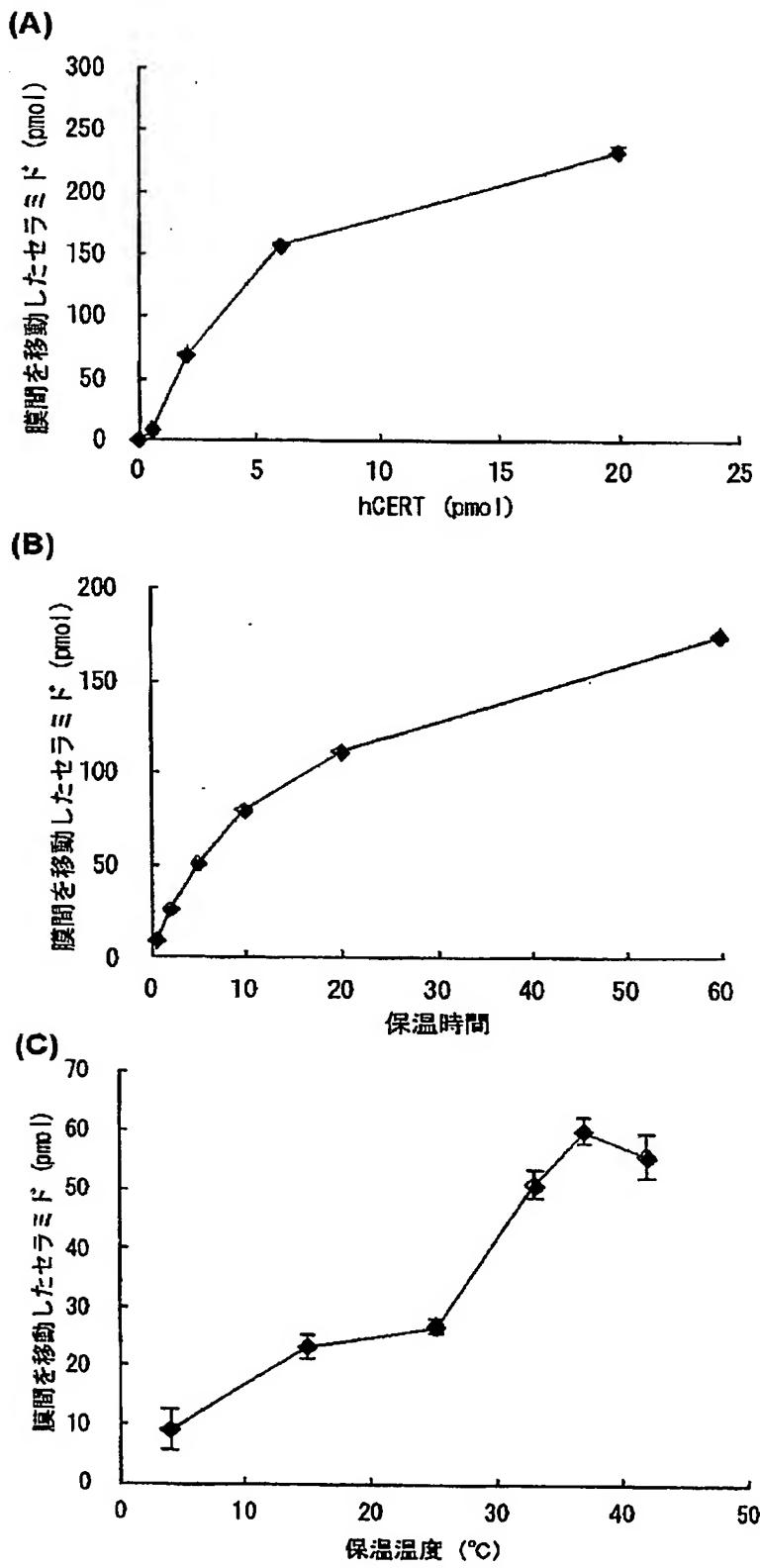
【図15】



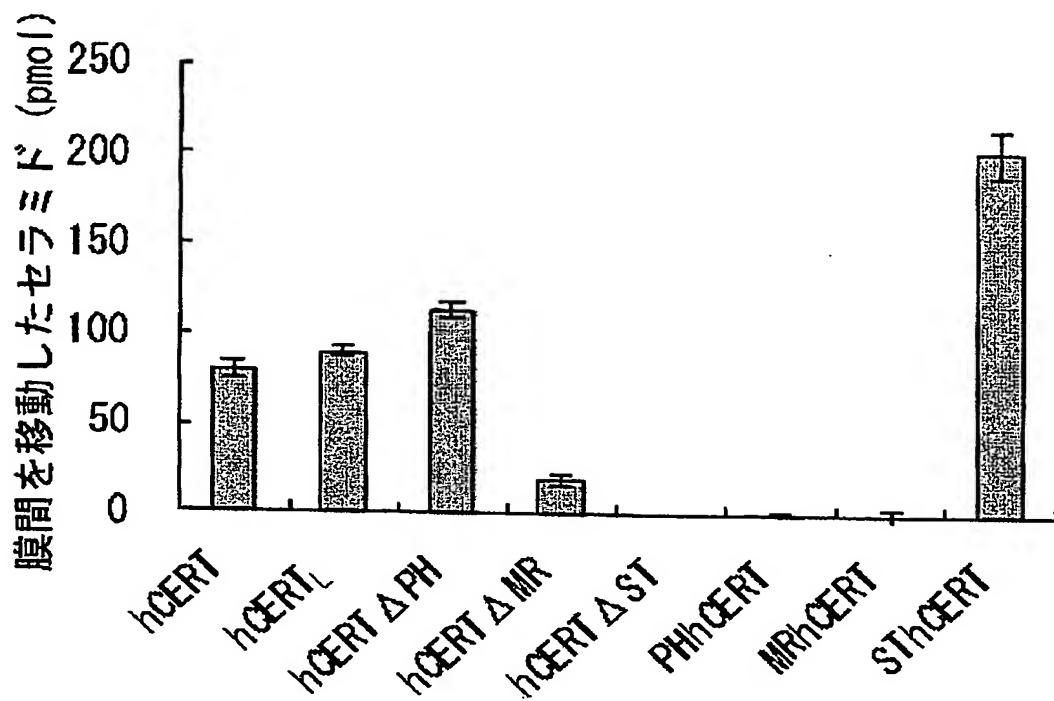
【図 16】



【図17】



【図18】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 セラミド輸送を促進する薬剤、該薬剤を製造する塩基配列、セラミド遊離を促進する活性の測定方法、及びセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供すること。

【解決手段】 配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質を有効成分として含有するセラミド輸送を促進する薬剤、配列番号3の塩基配列、セラミドを含有する脂質膜とセラミド遊離を促進する薬剤とを混合して得られた混合物を遠心法で分離することにより上清を得、得られた上清に含有されるセラミドを定量するセラミド遊離を促進する活性の測定方法、並びに受容膜とセラミド輸送を促進する薬剤とセラミドを含有する供与膜とを混合して得られた混合物に選択的膜凝集剤を添加後、遠心法に供して受容膜と供与膜を分離し、分離した受容膜及び供与膜が含有するセラミドを定量するセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】 特願2003-274232
【出願番号】
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 ☎ 102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2003-274232

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1： 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団

特願 2003-274232

出願人履歴情報

識別番号 [591222245]

1. 変更年月日 1997年 6月12日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都新宿区戸山一丁目23番1号
氏 名 国立感染症研究所長

特願 2003-274232

出願人履歴情報

識別番号 [503360115]

1. 変更年月日 2003年10月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏名 独立行政法人 科学技術振興機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.